

Cycloheximid: Wirkung
und ribosomale Resistenz
in *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Walter Stöcklein

aus München

1981

Cycloheximid: Wirkung
und ribosomale Resistenz
in *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Walter Stöcklein
aus München

- November 1981 -



1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Böck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R.J. Schweyen

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 12. 1981

ABKÜRZUNGEN

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm Wellenlänge
CM-	Carboxymethyl-
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
cs	kältesensitiv
EMS	Methansulfonsäure-Äthylester
MHK	minimale Hemmkonzentration
mRNS	Messenger-Ribonucleinsäure
NMNG	N-Methyl-N-Nitroso-N'-Nitroguanidin
ProRS	Prolyl-tRNS-Synthetase
psi	pounds pro inch ²
rRNS	ribosomale Ribonucleinsäure
S100	Überstand einer 100 000 g Zentrifugation
SDS	Na-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNS	Transfer- Ribonucleinsäure
ts	temperatursensitiv
ValRS	Valyl-tRNS-Synthetase
YGSC	Yeast Genetic Stock Center



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548318_0019

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	12
1. Verwendete Hefestämme	12
2. Medien	14
3. Anzucht- und Wachstumsbedingungen	15
4. Aufbewahrung von Kulturen	15
5. Präparation von Ribosomen, ribosomalen Untereinheiten und Überstandsfractionen	16
a) Zellaufschluß	16
b) Präparation von Niedrigsalzribosomen und S100 Extrakten	16
c) Präparation von Hochsalzribosomen und Hochsalz- überständen	17
d) Präparation ribosomaler Untereinheiten	17
6. Isolierung von Mutanten	18
a) Mutagenese	18
b) Isolierung temperatur- und kältesensitiver Mutanten	19
c) Isolierung antibiotikaresistenter Mutanten	19
d) Isolierung von Suppressormutanten	19
7. Genetische Methoden	20
a) Random-spore Analyse	20
b) Tetradenanalyse	20
8. Bestimmung der Einbaurrate radioaktiv markierter Vor- stufen	21
a) Doppelmarkierung zur in vivo Bestimmung der Protein- und RNS-Synthese	21

b) Bestimmung der Polyphenylalanin-Synthese im PolyU-abhängigen System	21
9. Bestimmung der Aktivität von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen im Aminoacylierungstest	22
10. Untersuchung der Aufnahme von $[^3\text{H}]$ -Cycloheximid	23
11. Elektrophorese-Methoden	23
a) Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	23
b) Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
12. Bestimmung der Antibiotikabindung an Ribosomen durch Gleichgewichtsdialyse	25
13. Immunologische Methoden	25
a) Antiserum-Präparation	25
b) Immundoppeldiffusion	26
14. Proteinchemische Methoden	26
a) Reinigung ribosomaler Proteine	26
b) Analyse tryptischer Peptide mittels Dünnschichtchromatographie	26
c) Spaltung ribosomaler Proteine mit Staphylococcus aureus-Protease V8	27
d) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung tryptischer Peptide	27
e) Bestimmung der Aminosäuresequenz von tryptischen Peptiden	28
15. Proteinbestimmung	28
16. Chemikalien und Bezugsquellen	29
C. ERGEBNISSE	30
I. Isolierung und Charakterisierung temperatur- und kältesensitiver Mutanten	30

1. Isolierung von Mutanten nach EMS-Mutagenese	30
2. Phänotypische Suppression von ts-Mutationen	30
a) Suppression durch hohe Salzkonzentration	30
b) Suppression durch hohe Aminosäure-Konzentrationen	31
3. Bestimmung der Protein- und RNS-Syntheserate bei restriktiver Temperatur	32
4. Bestimmung temperatursensitiver Aminoacyl-tRNS-Synthetase-Mutanten	33
5. Sedimentationsverhalten von Mutanten-Ribosomen	35
II. Untersuchungen an Aminoacyl-tRNS-Synthetase-Mutanten	35
1. Genetische Analyse der vas-x1 Mutation	35
a) Untersuchung des Zusammenhangs zwischen ValRS-Defekt und Temperatursensitivität	35
b) Versuch einer Kartierung des vas-x1 Gens	36
2. Isolierung und Charakterisierung von Revertanten	38
III. Isolierung und Charakterisierung Antibiotika-resistenter Mutanten	39
1. Isolierung der Mutanten	39
2. Charakterisierung Cycloheximid-resistenter Mutanten	40
a) Bestimmung der in vivo Resistenz	40
b) Bestimmung der Resistenz in heterodiploiden Stämmen	41
c) Untersuchungen zur Komplementation der Cycloheximid-Resistenz	41
IV. Charakterisierung von Cycloheximid-resistenten Mutanten mit verändertem ribosomalem Protein	42

1. Auftrennung der ribosomalen Proteine durch zwei-	42
dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
a) Vergleich der verschiedenen Elektrophoresesysteme	43
b) Elektrophoretisches Verhalten der veränderten	45
ribosomalen Proteine	
c) Nachweis der YL24-Proteine in heterodiploiden	49
Stämmen	
2. Genetische Untersuchungen	51
a) Segregationsanalysen	51
b) Kartierung des cyh-x32 Gens	52
3. Untersuchungen zur Cycloheximid-Resistenz in vivo	54
a) Bestimmung der Resistenz in heterodiploiden	54
Stämmen	
b) Aufnahme von [^3H]-Cycloheximid durch Wildtyp- und	56
Mutantenzellen	
4. Untersuchungen zur Cycloheximid-Resistenz in vitro im	57
PolyU-abhängigen System	
a) Abhängigkeit der Aktivität nativer Ribosomen von	57
der Cycloheximid-Konzentration	
b) Abhängigkeit der Aktivität homo- und heterologer	59
rekonstituierter Ribosomen von der Cycloheximid-	
Konzentration	
c) Abhängigkeit der Aktivität von Ribosomen aus	59
diploiden Stämmen von der Cycloheximid-Konzen-	
tration	
5. Kreuzresistenz von Mutantenribosomen gegenüber	61
anderen Proteinsynthese-Inhibitoren	
V. Untersuchung der Bindung von Cycloheximid an Ribosomen	62
aus Wildtyp und Cycloheximid-resistenten Mutanten	
mittels Gleichgewichtsdialyse	

1. Bindung von Cycloheximid an 80S Ribosomen	62
2. Bindung von Cycloheximid an ribosomale Untereinheiten	65
3. Einfluß von Überstandsfaktoren auf die Cycloheximid-Bindung durch 80S Ribosomen	65
4. Einfluß von Überstandsfaktoren auf die Cycloheximid-Bindung durch 60S Untereinheiten	68
5. Einfluß anderer Proteinsyntheseinhibitoren auf die Cycloheximid-Bindung durch 80S Ribosomen des Wildstamms A364A	70
VI. Reinigung des ribosomalen Proteins YL24 der Stämme A364A, 71 cy32 und sp1	
1. Präparation von 60S-ribosomalem Protein	71
2. Trennung der ribosomalen Proteine über CMC-Säule	71
3. Trennung ribosomaler Proteine über Phosphocellulose-P11-Säule	74
VII. Charakterisierung des ribosomalen Proteins YL24 aus Wildtyp A364A und den Mutanten cy32 und sp1	
1. Immunologische Untersuchung	75
2. Zweidimensionale Auftrennung tryptischer Peptide	76
3. Aminosäureanalysen	80
a) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Wildtyp- und Mutantenprotein YL24	80
b) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide T24, T24a, T24b und T24c	82
4. Auftrennung der durch Spaltung des Proteins YL24 vom Wildtyp und der Mutante sp1 mit Staphylococcus-Protease erhaltenen Peptide	84
5. Bestimmung der Aminosäuresequenz der tryptischen Peptide T24 und T24c	85

D. DISKUSSION	88
E. ZUSAMMENFASSUNG	99
F. LITERATURVERZEICHNIS	103

A. EINLEITUNG

Die Proteinbiosynthese als einer der zentralen biochemischen Vorgänge läuft in allen Organismen nach demselben Grundschemata ab (1). Drei Schritte lassen sich unterscheiden: Die Initiation der Übersetzung der Basensequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz des Proteins (Translation) besteht in der durch Initiationsfaktoren katalysierten Bildung eines Komplexes aus mRNA, formylierter bzw. nicht-formylierter Methionyl-tRNA und der kleinen Untereinheit des Ribosoms.

An der Elongation wirken Elongationsfaktoren und beladene tRNA-Moleküle mit. Die Aminoacylierung der tRNA mit der für sie spezifischen Aminosäure wird durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysiert. Schließlich ermöglichen Terminationsfaktoren den Kettenabbruch und die Freisetzung des fertigen Peptids. Alle diese Vorgänge sind abhängig von der Anwesenheit von Magnesium-Ionen und erhalten die notwendige Energie aus der Spaltung der Nukleotid-Triphosphate GTP und ATP.

Grundsätzliche Unterschiede in Aufbau und Organisation der Zelle haben zur Einteilung der Lebewesen in Pro- und Eukaryonten geführt. Diese Einteilung wurde durch eingehende vergleichende Untersuchungen der Proteinsynthese und des Translationsapparats in Vertretern beider Gruppen bestätigt (2):

So zeichnen sich die 80S-Ribosomen der Eukaryonten gegenüber den 70S-Ribosomen der Prokaryonten durch eine zusätzliche rRNA-Art (5,8S-rRNA), eine größere Zahl ribosomaler Proteine (70 bis 80 gegenüber etwa 53), ein durchschnittlich höheres Molekular-

gewicht sowohl der rRNS-Moleküle als auch der ribosomalen Proteine, sowie eine unterschiedliche Sensitivität gegen Antibiotika aus (3).

Die Bildung der ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten des Eukaryonten-Ribosoms erfolgt weitgehend im Zellkern (4).

Im Laufe der Evolution müssen sich also parallel zur Ausbildung der Kernmembran auch Transportmechanismen zur Einschleusung ribosomaler Proteine in den Zellkern und zur Ausschleusung von Vorläufern ribosomaler Untereinheiten in das Cytoplasma entwickelt haben.

Wesentliche Unterschiede bestehen auch in der Organisation und der Regulation der Expression der Strukturgene ribosomaler Komponenten. Während in Prokaryonten jedes ribosomale Protein von nur 1 Gen codiert wird, liegen in höheren Eukaryonten jeweils mehrere Gene in sogenannten Genfamilien vor (5). Auch in niederen Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* existieren Hinweise für eine Duplikation eines solchen Gens (6). Die Synthese der ribosomalen Komponenten wird sowohl in Pro- als auch Eukaryonten koordiniert reguliert; es werden unter keiner physiologischen Bedingung überschüssige ribosomale Komponenten angehäuft. Bei Prokaryonten wird dies durch autogene Kontrolle ribosomaler Proteine auf der Ebene der Translation erreicht; die Synthese ribosomaler Proteine ist dabei über rRNS bindende Proteine direkt an die Synthese der rRNS gekoppelt (7,8).

Bei Eukaryonten hingegen scheint die Regulation vor allem über einen erhöhten Abbau überschüssiger ribosomaler Komponenten im Zellkern zu funktionieren (9,10).

Die Aufklärung der Struktur und der Funktion prokaryontischer Ribosomen sowie die Kartierung der Gene für ribosomale Proteine ist zum großen Teil der Untersuchung von Mutanten zu verdanken (11,12). Die folgenden Klassen von Mutanten wurden dabei analysiert:

- a) kältesensitive Mutanten
- b) temperatursensitive Mutanten
- c) Antibiotika-resistente Mutanten
- d) Suppressormutanten, in denen die Defekte von Aminoacyl-trNS-Synthetasen physiologisch kompensiert werden
- e) Suppressormutanten, in denen Missense- und Nonsense-Mutationen auf der Translationsebene supprimiert werden.

Die Analyse kältesensitiver Mutanten hat ergeben, daß aufgrund der Veränderung eines ribosomalen Proteins Reifung und Assembly des Ribosoms bei tiefer Temperatur, z.B. 20°C, nicht mehr ablaufen können (13,14). Mit ihrer Hilfe konnte die Bedeutung einzelner ribosomaler Proteine für die Assembly geklärt werden.

Die Isolierung temperatursensitiver Mutanten führte zur Identifizierung von Veränderungen in weiteren ribosomalen Proteinen, die meist eine thermische Instabilität der Mutanten-Ribosomen bewirken (15).

Die Isolierung Antibiotika-resistenter Mutanten ermöglichte es, verschiedene Mutantenformen eines ribosomalen Proteins,

die zur Resistenz gegen das jeweilige Antibiotikum führen, zu charakterisieren. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß ribosomale Resistenz gegen Streptomycin ausschließlich auf Veränderungen im Protein S12 zurückzuführen ist (16). Neben resistenten ließen sich aber auch Streptomycin-abhängige Mutanten (17,18) und von diesen wiederum Streptomycin-unabhängige "Revertanten" isolieren (19,20).

Durch die Untersuchung solcher Mutanten stellte sich heraus, daß die Proteinsynthese-Genauigkeit in E.coli durch Veränderungen in den Proteinen S12, S17 und L6 erhöht (21,22), durch Veränderungen in den Proteinen S4 und S5 dagegen erniedrigt werden kann (23,24).

Solche "Fidelity"-Mutanten lassen sich durch die Suppression von Missense- und Nonsense-Mutationen in anderen Strukturgenen erkennen. Durch die Isolierung von Suppressor-Mutanten konnten jedoch nicht nur ribosomale Mutationen (25), sondern auch veränderte tRNS-Formen entdeckt werden (26,27).

Veränderte ribosomale Proteine wurden auch in temperatur-resistenten "Revertanten" von Stämmen mit einer temperatur-sensitiven Aminoacyl-tRNS-Synthetase nachgewiesen (28,29,30). Darüber hinaus gelang es, in Suppressoren von Mutanten, die aufgrund eines Defekts in der Ribosomen-Assembly kälte-sensitiv sind, zusätzliche Mutantenformen verschiedener ribosomaler Proteine zu identifizieren (31,32).

Die Analyse des Prokaryonten-Ribosoms steht, zumindest für wichtige Teilaspekte, vor dem Abschluß. So wurden alle ribo-

somalen Proteine sequenziert (H.G. Wittmann, persönliche Mitteilung). Ebenso konnten ihre Strukturgene nahezu vollständig kartiert werden (33). Die Modelle von Stöffler et al (34) und von Lake (35) veranschaulichen die weitgehend geklärten Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion der 70S-Ribosomen.

In den letzten Jahren hat sich das Interesse deshalb verstärkt auf die Analyse der Translation und des Translationsapparats von Eukaryonten gerichtet. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß auch hier über die Isolierung und Charakterisierung von Mutanten eine Fülle von Informationen gewonnen werden kann:

- In mehreren temperatur- (36) und kältesensitiven Hefemutanten wurden ribosomale Assembly-Defekte nachgewiesen (37,38). Diese konnten jedoch bisher in keinem einzigen Fall einer veränderten ribosomalen Komponente zugeordnet werden. So sind die einzigen 3 Proteine, deren Rolle in der Assembly der Ribosomen bekannt ist, solche, die erst im Cytoplasma an die im Nucleolus gebildeten Untereinheiten-Vorläufer gebunden werden (39).
- Die ersten Veränderungen in ribosomalen Proteinen wurden bei der Untersuchung Cycloheximid-resistenter Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe* (40) und *Podospora anserina* (41,42) gefunden. Emetin-Resistenz in Mutanten von CHO-Zellen konnte auf ein verändertes Protein der ribosomalen 40S-Untereinheit zurückgeführt werden (43,44). Kürzlich

wurde mit Hilfe einer Mutante von *S. cerevisiae* der Genort *tem1* für Trichodermin-Resistenz cloniert (45). Dabei stellte sich heraus, daß das Genprodukt mit dem ribosomalen Protein L3 identisch ist.

Für die Antibiotika Trichodermin und Anisomycin wurde spezifische Bindung an die ribosomale 60S-Untereinheit beschrieben (46). Daneben sind zahlreiche Proteinsynthese-Inhibitoren bekannt, die die Translation am 80S-Ribosom hemmen (3). Es ist demnach zu erwarten, daß weitere veränderte Proteine identifiziert werden, die zu Resistenz gegen einen dieser Inhibitoren führt.

- Das einzige veränderte ribosomale Protein in einer Mutante von *S. cerevisiae*, das bisher beschrieben wurde, beeinflußt die Proteinsynthese-Genauigkeit (47,48). Dies äußert sich in einer Suppression verschiedener Nonsense- und Missense-Mutationen (omnipotente Suppression). Für 2 weitere omnipotente Suppressor-Mutanten konnte ein ribosomaler Defekt gezeigt werden (49,50); die molekulare Ursache dieses Defekts ist bisher jedoch noch unbekannt.

Weitere Suppressormutanten wurden in großer Zahl von *S. cerevisiae* (51), *Podospora anserina* (52) und *Coprinus cinereus* (53) isoliert. Es sind überwiegend Codon-spezifische Suppressoren, mit deren Hilfe zahlreiche Mutantenformen verschiedener tRNS-Arten charakterisiert werden konnten (51).

- Die Proteinsynthese-Genauigkeit in Eukaryonten ist seit der Entdeckung von Bayliss und Vinopal (54), daß Streptomycin eine bestimmte Auxotrophie-Mutation in *S. cerevisiae* supprimieren kann, Ziel umfangreicher Untersuchungen geworden. Ähnlich wie in Prokaryonten wird sie von Magnesiumionen und Polyaminen beeinflusst (55,56). Da Vertreter der Aminoglycosid-Antibiotika in Prokaryonten die Fehlerrate der Translation erhöhen, wurde ihr Einfluß auch in Eukaryonten untersucht. Hier erwiesen sich die Paromamin-haltigen Aminoglycoside als besonders aktiv in der Stimulation von Fehltranslation (57,58,59). Mutanten von *Podospora anserina*, in denen die natürliche Proteinsynthese-Genauigkeit erhöht ist, wurden kürzlich beschrieben (60). Es ist wahrscheinlich, daß - ähnlich wie in Prokaryonten - bestimmte ribosomale Proteine einen negativen, andere einen positiven Einfluß auf die Translationsgenauigkeit besitzen.

Die Bereitstellung geeigneter Mutanten ist demnach eine wichtige Voraussetzung für die Aufklärung weiterer Details der Proteinsynthese und der Wirkung von Translations-Inhibitoren in Eukaryonten.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung und Charakterisierung solcher Mutanten. Die Wahl des hierfür geeigneten Organismus fiel auf *Saccharomyces (S.) cerevisiae*, da folgende Vorzüge gegenüber anderen eukaryontischen Systemen bestehen:

- Hefen besitzen ähnliche Wachstumseigenschaften wie Bakterien, mit allen Vorteilen für die Kultivierung.

- Die Bildung von 4 Ascosporen, das Vorkommen von 2 Paarungstypen sowie die genetische Stabilität der Zellen in der haploiden und in der diploiden Phase machen *S. cerevisiae* für die Isolierung rezessiver Mutanten und für genetische Untersuchungen besonders zugänglich.
- Die Kenntnis von bisher über 350 Genorten erleichtert die Kartierung unbekannter Gene (61), zumal das Genom von *S. cerevisiae* nur dreimal so groß ist wie das von *E. coli* (62).

Viele der bisher charakterisierten Mutanten mit ribosomalen Defekten gehen auf die Arbeit von Hartwell (63) zurück, der 400 temperatursensitive Mutanten von *S. cerevisiae* isolierte und 21 davon als Proteinsynthesemutanten klassifizierte. Dazu gehören 2 Aminoacyl-tRNA-Mutanten mit veränderter Isoleucyl-tRNA-Synthetase (IleRS) (64) bzw. Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) (65) sowie Assembly-Mutanten, die Vorstufen ribosomaler RNS bei restriktiver Temperatur nicht prozessieren können (37,66). Ähnliche Assembly-Defekte fanden sich auch in kältesensitiven Mutanten (36,38,67).

Mit der Isolierung weiterer temperatur- und kältesensitiver Mutanten befaßt sich der erste Teil der Arbeit. Dabei konnten 2 neue Mutanten mit veränderter Aminoacyl-tRNA-Synthetase identifiziert werden. Sie wurden durch in vivo und in vitro Versuche näher charakterisiert.

Der zweite Teil der Arbeit behandelt die Isolierung Antibiotikaresistenter Mutanten von *S. cerevisiae*. Die Wirkung von Cycloheximid in Wildtyp- und Mutanten-Zellen sowie die Resistenzursachen in 2 Cycloheximid-resistenten Mutanten wurden dabei

eingehender analysiert. Dieser Inhibitor der Proteinbiosynthese in Eukaryonten, der zu den von Streptomyceten produzierten Glutarimid-Antibiotika gehört, verdient aus folgenden Gründen besonderes Interesse:

- Es ist das erste Antibiotikum, für das Resistenz durch ein verändertes ribosomales Protein in Eukaryonten nachgewiesen werden konnte (39,40,68).
- Resistenz gegen Cycloheximid kann eine Eigenschaft nicht nur der ribosomalen 60S-, sondern auch der 40S-Untereinheit sein (69).
- Cycloheximid-Resistenz wurde häufig in kältesensitiven Mutanten nachgewiesen (67,70,71). Dies weist auf einen Zusammenhang mit einem Defekt in der Assembly der Ribosomen hin.
- Es gibt Hinweise, daß Cycloheximid die Proteinsynthesegenauigkeit beeinflusst (52; A.P. Surguchov, persönliche Mitteilung), was bisher nur für Aminoglycosid-Antibiotika beschrieben ist.
- Cycloheximid hemmt nahezu alle Phasen der Translation (3) und scheint folglich mit einem funktionell zentralen Bereich des Ribosoms in Wechselwirkung zu treten.

Der Einfluß von Cycloheximid auf die Translationsvorgänge ist konzentrationsabhängig: In niedrigen Konzentrationen hemmt das Antibiotikum vor allem die Initiation, in höheren vorzugsweise die Elongation (72,73), hier besonders die EF-2 abhängige und die unspezifische Translokation sowie die Transpeptidierung. Auch die Termination wird beein-

fließt. Charakteristisch für die Wirkung von Cycloheximid ist eine Hemmung des Zerfalls und der Neubildung der Polysomen. Man spricht von einem "Einfrieren" der Polysomen.

Die Untersuchungen zur Wirkung von Cycloheximid und zu den Resistenzmechanismen von Mutanten sollte zur Klärung folgender Fragen beitragen:

- Mit welcher Affinität und Spezifität bindet Cycloheximid an Ribosomen von Wildtyp- und Mutantenstämmen? Nach Berechnungen von Cooper et al (73) hemmen bereits 1 bis 2 Moleküle pro Ribosom die Polyphenylalanin-Synthese im PolyU-abhängigen System zu 50%, was auf das Vorhandensein einer hochaffinen Cycloheximid-Bindungsstelle hinweist.
- Wird Cycloheximid von der Hefezelle aktiv aufgenommen und akkumuliert? Bisher ist noch nicht geklärt, ob Resistenz gegen Cycloheximid Folge einer veränderten Aufnahme in die Zelle sein kann. In der Literatur ist lediglich ein Hinweis auf freie Permeabilität der Zellwand von Hefemutanten für den Inhibitor zu finden (73).
- Welche ribosomalen Komponenten sind für die Sensitivität gegenüber Cycloheximid verantwortlich? In anderen Eukaryonten konnte gezeigt werden, daß veränderte Proteine der ribosomalen 60S-Untereinheit Cycloheximid-Resistenz verursachen (40,41,42).
- Welcher Art sind die Veränderungen, die zu Resistenz gegen Cycloheximid führen? Untersuchungen an Bakterien führten zu

dem Ergebnis, daß ribosomale Mutationen, die Antibiotika-Resistenz zur Folge haben, nur in bestimmten eng umrissenen Bereichen eines ribosomalen Proteins auftreten (16). Von Eukaryonten fehlen vergleichbare Daten bisher völlig.

- Sind Cycloheximid-resistente Mutanten bzw. deren Ribosomen kreuzresistent gegen andere chemisch nicht verwandte Translations-Inhibitoren? In der Literatur ist lediglich ein Hinweis zu finden, daß bestimmte Cycloheximid-resistente Mutanten zugleich sensitiv gegen Emetin sind (74). Emetin ist ein Pflanzenalkaloid, das auf die ribosomale 40S-Untereinheit wirkt und damit die Translation hemmt (3).
- Wo ist die Resistenzmutation in den Stämmen, die ein verändertes ribosomales Protein besitzen, genetisch lokalisiert? Bisher sind 5 Cycloheximid-Resistenzgene kartiert (61). Eine ribosomale Resistenz wurde jedoch nur für cyh2-Mutanten beschrieben (74).

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Verwendete Hefestämme

Die genetischen Merkmale und die Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Stämme der Hefe *Saccharomyces (S.) cerevisiae* sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Genbezeichnungen wurden von Mortimer und Schild (61) übernommen. Der Paarungstyp ist mit a bzw. α bezeichnet.

Tabelle 1: Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Herkunft
A364A	a ade1 ade2 ura1 gal1 tyr1 his7 lys2	YGSC
Y166	α his4 trp5 MAL1	YGSC
S288C	α gal2 pet mal	YGSC
SL210-3A	a ade3 ilv1 leu2 met8 phe trp1 his5 tyr7 lys1	YGSC
X2928-3D1C	α ade1 gal1 leu1 his2 ura3 trp1 met14	YGSC
XS144-S19	a met13 leu1 trp5 cyh2 aro2 lys5 ade5	YGSC
XS144-11A	α leu2 trp1 arg9 his6 ilv3 met14 pet8 pet19 gal	YGSC
X3163-2A	α arg1 met1 trp3 ade5 mal gal2	YGSC
D585-11C	a lys1	YGSC
D587-4B	α his1	YGSC
X3127-2A	a leu1 leu2 trp1 pet17 ura3 his5 ade met	YGSC
KD115	α gal2 ole1 pet MAL	YGSC
ts437	a tsm437, sonst wie A364A	YGSC
ts296	a mes1, sonst wie A364A	YGSC

19.3.4	a mes1 ade1 leu2 his5 lys11 met pet gal	YGSC
ts341	a ils1, sonst wie A364A	YGSC
ts13	a prs-x1, sonst wie A364A	diese Arbeit
ts181	a vas-x1 sup-x, sonst wie A364A	diese Arbeit
V1-4C	α vas-x1 arg9 leu2 his7 tyr1 lys2 gal1	aus ts181 x X3144-11A
V1-6B	a vas-x1 met14 trp1 ura1 his7 lys2 gal1	aus ts181 x X3144-11A
I1-7R	α ils1 ilv3 arg9 trp1 pet	aus ts341 x X3144-11A
M1-12R	α mes1 arg1 trp3 met ade his5 leu2 gal lys11	aus 19.3.4 x X3163-2A
cy32	a cyh-x32, sonst wie A364A	diese Arbeit
cy3D	α cyh-x32 ade1 ade2 ura1 his7 tyr1 trp5 gal1 pet	aus cy32 x Y166
XSX6	α trp5 aro2 met13 lys5 ade5 leu1	aus XS144- S19 x Y166
XSX39	α cyh2 trp5 MAL1	aus XS144- S19 x Y166
XSX6-32-1	α cyh-x32 his7	aus XSX6 x cy32
DX1	a thr1 arg4	aus D587-4B x X3127-2A
A-1	a ade6 leu1 trp5-67 ura1	B. Littlewood, Madison
sp1	a cyh, sonst wie A-1	B. Littlewood
SR17	α cyh2, sonst wie Y166	B. Littlewood
200-1	α Derivat von SR17 (höherresistent)	B. Littlewood

Die Genbezeichnung *prs-x1* für den Stamm *ts13* wurde in Analogie zu den bereits beschriebenen Genorten *ils1* und *mes1* eingeführt und bezeichnet das für die Prolyl-tRNS-Synthetase codierende Gen. Der vorläufige Charakter dieser Bezeichnung wird durch den Zusatz *x* angedeutet. Dasselbe gilt für *vas-x1*, das Strukturgen der Valyl-tRNS-Synthetase und für *cyh-x32*, das Resistenzgen der Mutante *cy32*.

2. Medien

Folgende Medien wurden verwendet:

Vollmedium (YPAD): 0,5% Hefeextrakt, 1% Pepton, 2% Glucose,
je 20 mg/l Adenin, Uracil und Threonin

Minimalmedium (SD): 0,67% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren,
steril filtriert, 2% Glucose. Zur Supplementation wurden Aminosäuren in Endkonzentrationen von 20 bis 375 mg/l zugesetzt.

Reduziertes Vollmedium (YM-5): 0,1% Hefeextrakt, 0,2% Pepton,
1% Na-Succinat, 0,67% Yeast Nitrogen Base,
1% Glucose, je 10 mg/l Adenin und Uracil.
Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 5,8 eingestellt.

Glycerinmedium (YPG): 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 3% Glycerin

Präsporulationsmedium: 0,8% Hefeextrakt, 2% Pepton, 10% Glucose

Sporulationsmedium: 1% Kaliumacetat, 0,1% Hefeextrakt,
0,05% Glucose

Für die Herstellung fester Medien wurde Agar in einer Endkonzentration von 2% den Medien zugesetzt.

3. Anzucht- und Wachstumsbedingungen

Kulturen bis zu 200 ml wurden in Erlenmeyerkolben in New Brunswick-Wasserbadschüttlern angezogen. Die Anzuchttemperatur betrug 26°C. Das Wachstum wurde durch Messung der Zunahme der optischen Dichte bei 546 nm (A_{546}) mit Hilfe eines Hitachi-Photometers verfolgt. Bei einer Dichte von 2 A_{546} , also in der exponentiellen Phase entsprechend einem Titer von 4×10^7 Zellen/ml wurde das Wachstum durch Abkühlen des Kolbens im Eisbad unterbrochen.

15 min vor dem Ernten wurde, soweit ein Zerfall der Polysomen in Monosomen erwünscht war, festes NaN_3 auf eine Endkonzentration von 1mM zugegeben (75). Die Zellen wurden 10 min bei 3 500 g abzentrifugiert, anschließend mit Puffer 1 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 12,5 mM MgAcetat; 80 mM KCl; 1 mM Dithiothreitol) zweimal gewaschen und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -70°C aufbewahrt. Für Großanzuchten stand ein Fermenter (Modell Braun Biostat U50D) zur Verfügung. Nach Beendigung der Fermentation wurde der Fermenterinhalt auf 10°C abgekühlt und die Zellen mit einer Durchlaufzentrifuge geerntet.

4. Aufbewahrung von Kulturen

Alle verwendeten Stämme wurden auf YPAD-Platten bei 4°C gelagert und nach spätestens 4 Monaten überimpft. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden Glycerinkulturen angelegt, indem von einer frischen Übernackkultur auf YPAD Agar eine Öse mit Zellen in

50% Glycerin in YPAD Medium suspendiert wurde. Die Zellen konnten so bei -20°C mindestens 2 Jahre lang gelagert werden.

5. Präparation von Ribosomen, ribosomalen Untereinheiten und Überstandsfractionen

a) Zellaufschluß

Zum Aufbrechen der Zellen kamen folgende Methoden zur Anwendung:

- Aufbruch in der French Press Zelle bei 20 000 psi.
- Schütteln im Braun-Homogenisator (60 sec bei 4 000 Umdrehungen pro min) unter Kühlung mit flüssigem CO_2 . Dazu wurden die Zellen mit 1 Volumen Puffer 1 und 4 Volumen Glaskugeln (0,45 mm Durchmesser) vermischt. Diese Methode eignet sich besonders für den schonenden Aufbruch größerer Zellmengen.
- Verreiben der Zellen mit doppelter Menge Seesand (30 min bei 0°C) im Mörser. Diese Methode ist hinsichtlich der Ausbeute an Ribosomenaktivität am schonendsten und wurde zur Präparation von Ribosomen für in vitro Einbau- und Bindungsversuche verwendet.

b) Präparation von Niedrigsalzribosomen und S100 Extrakten

Der Zellrohextrakt wurde zweimal 15 min bei 30 000 g zentrifugiert. Aus dem erhaltenen Überstand (S30 Extrakt) wurden die Ribosomen durch 2-stündiges Zentrifugieren bei 100 000 g sedimentiert. Sie werden als Niedrigsalzribosomen bezeichnet. Die oberen $\frac{3}{4}$ des Überstands wurden als S100 Extrakt weiterverwendet, der Rest verworfen.

c) Präparation von Hochsalzribosomen und Hochsalzüberständen

Zur Gewinnung hochsalzgereinigter Ribosomen wurden Niedrigsalz-ribosomen durch einen Zweistufengradienten aus 20% und 40% Saccharose (Volumen-Verhältnis 1:1,5) in Puffer 3 (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM MgAcetat; 500 mM NH_4Cl ; 5 mM Mercapto-Äthanol) zentrifugiert. Im vereinfachten Verfahren zur Präparation von Hochsalzribosomen und -überstand wurden Niedrigsalzribosomen in einer Konzentration von 500 A_{260}/ml in Puffer 3 suspendiert und 2 Stunden bei 100 000 g sedimentiert. Die oberen 3/4 des Überstands wurden als Hochsalzüberstand abgehoben, das restliche Viertel verworfen.

d) Präparation ribosomaler Untereinheiten

Dazu wurden 80S Ribosomen in Puffer 4 (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 500 mM KCl; 5 mM MgAcetat; 1 mM Dithiothreitol) suspendiert und zur vollständigen Dissoziation in Untereinheiten 10 min bei 30°C inkubiert. Die Auftrennung der 40S und 60S Partikel erfolgte durch Zentrifugation unter Verwendung eines Gradienten aus 10%-30% Saccharose in Puffer 4 nach einer der folgenden Methoden:

- Für die Präparation kleiner Mengen von Untereinheiten wurde ein Vertikalrotor (Sorvall TV850) verwendet. Die Gradienten wurden mit je 150 A_{260} Ribosomen beladen, 1 Stunde bei 135 000 g und einer Temperatur von 10°C zentrifugiert und anschließend von oben entleert. Über ein an die Pumpe angeschlossenes Spektral-Photometer wurde das Absorptionsprofil des Gradienten bei 260 nm registriert. Die gesammelten Fraktionen wurden mit Puffer 2 im Verhältnis 1:1 verdünnt, die ribosomalen Partikel daraus durch 16-stündige Zentrifugation bei 100 000 g sedimentiert. Daraufhin wurden sie

resuspendiert und gegen das 100-fache Volumen an Puffer 2 dialysiert.

- Mengen bis zu 1 g 60S bzw. 0,4 g 40S Partikel wurden mit Hilfe eines Zonalrotors (Beckman, Ti-15) präpariert. Nach Auftragen von bis zu 20 000 A_{260} Ribosomen wurde 12 Stunden bei 124 000 g (Lauftemperatur 10°C) zentrifugiert. Danach wurde der Gradient entleert und in 20 ml Fraktionen aufzufangen. Nach Messung der A_{260} jeder zweiten Fraktion (1:80 verdünnt) wurden die 60S bzw. 40S Partikel enthaltenden Fraktionen vereinigt, anschließend zentrifugiert, resuspendiert und dialysiert wie oben beschrieben.

Ribosomen, Untereinheiten, S100-Extrakt und Hochsalzüberstand wurden unmittelbar vor der Weiterverwendung durch 15 minütiges Zentrifugieren bei 30 000 g von partikulären Verunreinigungen befreit. Die Präparationen konnten bei -70°C mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

6. Isolierung von Mutanten

a) Mutagenese

EMS-Mutagenese erfolgte nach der von Fink (76) beschriebenen Methode. Die Inkubation mit 4% EMS bei 30°C wurde nach 50 min durch Zugabe von 5% Natriumthiosulfat unterbrochen. Nach Entfernen des Mutagens durch mehrmaliges Zentrifugieren und Waschen wurden die Zellen auf 100 Röhrchen mit je 5 ml YPAD Medium aufgeteilt und 2 Tage bei 26°C geschüttelt.

NMNG wurde für die Mutagenese in einer Konzentration von 10^{-3} M bei 15 min Inkubationszeit verwendet. Ansonsten entsprachen die Bedingungen denen der EMS-Mutagenese. Das gilt auch für Acridinorange, dessen Einwirkungszeit bei einer

Konzentration von 10^{-3} M 5 min betrug. UV-Bestrahlung von Zellen auf YPAD-Agar erfolgte mit einer Intensität von 2000 erg/mm^2 .

Die angegebenen Mutagenesezeiten waren jeweils in Vorversuchen ermittelt worden. Sie entsprechen einer Überlebensrate von 10% der behandelten Zellen.

b) Isolierung temperatur- und kältesensitiver Mutanten

EMS-mutagenisierte Zellen wurden nach dem Hochwachsen in die stationäre Phase in 10^{-6} Verdünnung auf YPAD-Medium plattiert und nach 4-tägiger Bebrütung bei 26°C auf 2 weitere YPAD-Platten überstempelt. Eine der beiden Platten wurde 2 Tage bei 36°C , die andere 7 Tage bei 15°C inkubiert. Isolate, die bei 36°C (15°C) kein Wachstum zeigten, wurden über Einzelkolonieausstriche gereinigt und nochmals auf Temperatursensitivität bzw. Kältesensitivität untersucht.

c) Isolierung antibiotikaresistenter Mutanten

Mutanten wurden spontan oder nach Mutagenese auf YPAD Platten selektioniert, die jeweils eine dem 10-fachen MHK-Wert entsprechende Konzentration an Cycloheximid, Verrucaridin A, Trichodermin, Emetin, Anisomycin bzw. Hygromycin B enthielten. UV-bestrahlte Zellen erhielten eine Expressionszeit von 6 Stunden. Danach wurde der Agar mit 0,1 ml einer sterilen Antibiotikumlösung unterschichtet, deren Konzentration für 20 ml Agarvolumen berechnet war.

d) Isolierung von Suppressormutanten

Von temperatursensitiven Aminoacyl-tRNS-Synthetase-Mutanten wurden spontane "Revertanten" isoliert. Dazu wurden 10^7 bis 10^8 Zellen pro YPAD-Platte 6 Tage bei 37°C inkubiert. Zur Ver-

meidung von Mehrfachisolierungen wurden Zellen von verschiedenen Klonen des Mutterstamms jeweils auf 1 YPAD-Platte ausgespatelt und höchstens 1 "Revertante" pro Platte verwendet.

7. Genetische Methoden

a) Random-spore Analyse

Die von Siddiqi (77) beschriebene Random-spore Analyse wurde angewandt, um eine große Zahl von Sporen auf Rekombination untersuchen zu können, wenn eine geringe Rekombinationshäufigkeit zu erwarten war. Weiterhin wurden nach dieser Methode Sporen mit definierten Eigenschaften isoliert. Bei diesem Verfahren wurde eine Asci enthaltende Zellsuspension mit Glusulase, einem Glucuronidase enthaltenden Verdauungssaft aus Schnecken, 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Dabei wird die Zellwand der vegetativen Zellen und der Asci weitgehend abgebaut, nicht aber die der Sporen. Diese wurden durch Ultraschallbehandlung aus den zusammen mit den nichtsporulierten Zellen lysierenden Asci freigesetzt. Entsprechende Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden entweder auf YPAD Agar oder direkt auf Selektivmedien ausgespatelt.

b) Tetradenanalyse

Tetradenanalyse zur meiotischen Kartierung wurde nach (78) durchgeführt. Dabei wurden Zellen mit Glusulase behandelt, jedoch weniger lang wie bei der Random-spore Analyse. Mit Hilfe eines Mikromanipulators (E^{ts} Beaudouin Paris) wurden die Tetradensporen getrennt (79). Pro YPAD Platte konnten die Sporen von 12 Asci getrennt werden. Nach dem Anwachsen wurden 32 Sporenkolonien einer Platte ausgestrichen und nach 2 Tagen Inkubation mit einem dafür entwickelten Stempel auf die Testplatten übertragen.

8. Bestimmung der Einbaurrate radioaktiv markierter Vorstufen

a) Doppelmarkierung zur in vivo Bestimmung der Protein- und RNS-Synthese

Zu 10 ml einer Kultur in YM-5 Medium wurden bei einer optischen Dichte von 0,5 A_{546} $[^3\text{H}]$ -Uracil und $[^{14}\text{C}]$ -L-Lysin in einer Endkonzentration von 0,1 mM bzw. 5 μM und einer Aktivität von 1 mCi/ml bzw. 0,05 mCi/ml gegeben. Ein Parallelansatz ohne radioaktiv markierte Vorstufen diente zur Messung des Wachstums und zur Bestimmung der Überlebensrate. Nach 2,5 bis 3 Stunden Wachstum bei 20°C wurden die Kulturen in Wasserbadschüttler mit 36°C bzw. 15°C überführt. Im Fall der temperatursensitiven Mutanten wurden nach 2, 4 und 6 Stunden je 0,5 ml Kultur mit 1 ml kalter 10%iger Trichloressigsäure (TCA) vermischt, das entstandene Präzipitat auf einem Glasfaserfilter (Schleicher und Schüll) gesammelt, mit TCA und kaltem 70%igem Äthanol gewaschen und getrocknet. Die Radioaktivität von ^3H und ^{14}C sowie das Verhältnis $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ wurde im Szintillationszähler bestimmt. Die Probennahmezeiten für kältesensitive Stämme waren 2, 4, 7, 20 und 23 Stunden nach dem Temperaturwechsel. Die in dieser Arbeit isolierten temperatur- und kältesensitiven Stämme wurden auf ihre Fähigkeit zur Makromolekülsynthese bei restriktiver Temperatur untersucht, wobei nach einer Modifikation der von Hartwell (63) beschriebenen Methode verfahren wurde.

b) Bestimmung der Polyphenylalanin-Synthese im PolyU-abhängigen System

Das von Carter et al (80) beschriebene Testsystem wurde mit einigen Änderungen übernommen. Das Reaktionsgemisch hatte ein Endvolumen von 50 μl und war folgendermaßen zusammengesetzt: .

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 80 mM KCl; 12,5 mM MgAcetat; 1 mM Dithiothreitol; 1 mM ATP; 0,05 mM GTP; 4 mM Kreatinphosphat; 2 μ l Kreatinphosphat-Kinase; 25 μ g Hefe-tRNS; 15 μ g PolyU; 10 μ l S100 (10 mg Protein/ml); 0,8 A₂₆₀ Ribosomen bzw. 0,5 A₂₆₀ ribosomale Untereinheiten; 0,012 mM [¹⁴C]-Phenylalanin (50 μ Ci/ μ Mol). Die Inkubationsdauer betrug 20 min bei einer Temperatur von 30°C. Anschließend wurde das Testgemisch mit einem Überschuß an kalter 10%iger TCA gemischt und 15 min bei 90°C inkubiert. Das Filtrieren, Waschen und Trocknen der Proben und die Bestimmung der Radioaktivität im TCA-präzipitierbaren Material erfolgte wie oben beschrieben. Aus der spezifischen Radioaktivität wurde errechnet, daß 100 cpm einer Menge von 1 pMol [¹⁴C]-Phenylalanin entsprechen.

9. Bestimmung der Aktivität von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen im Aminoacylierungstest

Die Aminoacylierung wurde nach (81) durchgeführt. Der Inkubationsansatz bestand in einem Endvolumen von 100 μ l aus 100 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM Mg-Acetat; 10 mM KCl; 4 mM reduziertes Glutathion; 10 mM ATP; 400 μ g Hefe-tRNS; 50 μ g S100-Protein und 20 bzw. 50 μ M [¹⁴C]-Aminosäure (10 μ Ci/ μ Mol). Die Inkubation wurde parallel bei 25°C und 36°C durchgeführt und nach 30 min durch Zugabe von 1 ml 10%iger TCA beendet. Filtrieren und Trocknen der Proben sowie die Radioaktivitätsbestimmung erfolgten wie beschrieben. Die zum Nachwaschen der Filter verwendete 5%ige TCA enthielt 1% Casamino-säuren.

10. Untersuchung der Aufnahme von $[^3\text{H}]$ -Cycloheximid

Die verwendeten Stämme wurden in 10 ml YPAD- oder supplementiertem SD-Medium bei 30°C angezogen. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 2 A_{546} wurde $[^3\text{H}]$ -Cycloheximid zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml (0,86 µCi/ml) zugegeben. Je 0,5 ml wurden zum Zeitpunkt 0, 2, 5, 10, 30, 60 und 120 min nach Beginn der Markierung filtriert, die Filter wurden mit 10 ml YPAD-Medium gewaschen und getrocknet. Ihre Radioaktivität wurde wie oben beschrieben bestimmt. Weitere Proben wurden 0, 2, 10 und 60 min nach Zugabe von nichtmarkiertem Cycloheximid in einer Endkonzentration von 50 µg/ml im Anschluß an die 2 stündige Markierungsperiode entnommen und entsprechend weiterverarbeitet.

11. Elektrophorese-Methoden

a) Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Aus Ribosomen in Puffer 2 wurde mit einem mindestens 10-fachen Überschuß an Aceton ribosomales Protein präzipitiert, 5 min bei 5 000 g abzentrifugiert, getrocknet und in Lysis-Puffer, bestehend aus 60 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% Glycerin, 5% Mercaptoäthanol und 2% SDS, 15 min bei 80°C gelöst (82). 20 bis 40 µg ribosomales Protein wurden auf 10-25% Polyacrylamid-SDS-Gradientengele aufgetragen und wie in (83) beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Bromphenolblau diente als Indikator für die Elektrophoresefront. Die Abmessung der Gele betrug 0,15 x 13 x 10 cm bzw. 0,1 x 13 x 25 cm. Zum Anfärben der Proteine wurde 0,2% Coomassie in Methanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 3:1:6 verwendet.

b) Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ribosomales Protein wurde aus Ribosomen bzw. ribosomalen Untereinheiten durch Essigsäurefällung extrahiert (84).

3 verschiedene Elektrophorese-Systeme kamen zur Anwendung:

- System A nach Mets und Bogorad (85) mit einigen Änderungen.
Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgte bei einem pH von 5,0 entsprechend der Ladung der Proteine. Vor dem Befestigen auf den Gelen für die 2. Dimension wurden die Gele der 1. Dimension 45 min in 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 mit 1% SDS äquilibriert. Für die 2. Dimension wurden 15% Polyacrylamid-SDS-Gele und das Puffersystem nach (67) verwendet. Dabei werden die Proteine nach Größe aufgetrennt. Die Elektrophorese in der 2. Dimension dauerte 4 Stunden bei 40 mA pro Gel.
- System B nach Kaltschmidt und Wittmann (86).
Die Trennung der Proteine erfolgt in der 1. Dimension bei pH 8,6 sowohl nach Ladung als auch nach Größe der Proteine, in der 2. Dimension bei pH 4,5 in 18% Polyacrylamid-Harnstoffgelen vorwiegend nach Größe bzw. Dichte.
- System C nach Geyl et al (87).
- Dieses Verfahren entspricht neben einigen Modifikationen einer Kombination aus der 1. Dimension nach Mets und Bogorad und der 2. Dimension nach Kaltschmidt und Wittmann.

Die Gelabmessungen betrugen für alle 3 Systeme 0,5 x 9 cm in der 1. Dimension und 0,3 x 9 x 9 cm in der 2. Dimension. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau gefärbt wie für die eindimensionale Elektrophorese beschrieben.

12. Bestimmung der Antibiotikabindung an Ribosomen durch Gleichgewichtsdialyse

Die Bestimmung der Assoziationskonstanten K_A und der Stöchiometrie der Bindung von Tritium-markiertem Cycloheximid an Ribosomen bzw. ribosomale Untereinheiten erfolgte mit Hilfe der in (88) beschriebenen Gleichgewichtsdialyse. Alle Lösungen wurden in Puffer 2 angemacht. $[^3\text{H}]$ -Cycloheximid (1,2 mCi/ μMol) wurde in 11 verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,22 μM und 1,79 μM eingesetzt, für Einzelpunktmessungen in einer Konzentration von 0,36 μM . Die Menge der eingesetzten Ribosomen war für jede Messreihe konstant und lag bei etwa 0,4 μM . Als Berechnungsgrundlage dienten folgende Werte: 14 A_{260} entsprechen 1 mg Ribosomen. (89). Die Molekulargewichte für 80S, 60S und 40S ribosomale Partikel betragen $3,6 \times 10^6$, $2,57 \times 10^6$ und $1,01 \times 10^6$ (90). S100 und Hochsalzüberstand wurden in Endkonzentrationen von 8 bzw. 0,31 bis 0,42 mg Protein pro ml eingesetzt.

13. Immunologische Methoden

a) Antiserum-Präparation

Ein Kaninchen wurde in Abständen von 2 Wochen dreimal mit je 0,5 mg gereinigtem Protein YL24 immunisiert. Dazu wurde das Protein in 8 M Harnstoff angelöst, mit sterilem H_2O verdünnt und schließlich im Verhältnis 1:1 mit Freund'schem Adjuvans vermischt, so daß in einem Endvolumen von 0,5 ml die Harnstoff-Konzentration 1 M betrug. Für die 1. Injektion wurde komplettes, für die 2. und 3. Injektion inkomplettes Adjuvans verwendet. Nach weiteren 2 bzw. 4 Wochen wurden jeweils 40 ml Blut abgenommen. Dabei wurde nach der in (91) beschriebenen Methodik verfahren.

b) Immundoppeldiffusion

Bei der von Stöffler (92) modifizierten Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony (93) wurden Glasplatten 0,2 mm hoch mit aufgeschmolzener Agarose (0,7%) in Veronalpuffer pH 8,6, 10 mM MgAcetat und 750 mM LiCl beschichtet. Ein hexagonales Lochmuster wurde mit Hilfe einer von Gelman Instrument Company entwickelten Vorrichtung hergestellt. Die Lochdurchmesser betrugen 0,3 mm, die Abstände voneinander 0,5 mm. In das zentrale Loch wurden 10 µl unverdünntes Antiserum, in die äußeren Löcher je 10 µg gereinigtes Protein YL24 in einem Volumen von 10 µl pipettiert.

14. Proteinchemische Methoden

a) Reinigung ribosomaler Proteine

Die Isolierung des ribosomalen Proteins YL24 erfolgte nach der von Itoh et al (94) beschriebenen Methode für die Reinigung des Proteins YP41 der großen ribosomalen Untereinheit (YL24 nach der in dieser Arbeit verwendeten Nomenklatur). Zur Identifizierung der Proteine in den Säulenfraktionen wurden 0,2 ml jeder 3. bzw. 5. Fraktion gegen 1% Essigsäure dialysiert, lyophilisiert und durch eindimensionale Gelelektrophorese wie oben beschrieben analysiert.

b) Analyse tryptischer Peptide mittels Dünnschichtchromatographie

Nach dem durch (95) beschriebenen Verfahren wurden jeweils 500 µg gereinigtes Protein mit 10 µg Trypsin (Merck, TPCK-behandelt, 3,5 U/mg) gespalten. Zur Analyse der tryptischen Peptide wurden 5 bis 10 nMol verdautes Protein auf 20 x 20 cm Dünnschichtplatten (Macherey und Nagel: Polygram Cel 300) in einem Volumen von 7 µl aufgetragen und durch Elektrophorese

in der 1. Dimension und Chromatographie in der 2. Dimension aufgetrennt (96). Besprühen der Platten mit Fluorescamin nach (97) und anschließende UV-Bestrahlung (254 nm) führte zur Sichtbarmachung der Peptide. Besprühen mit Phenanthrenchinon nach (98) lieferte eine spezifische Fluoreszenzmarkierung Arginin enthaltender Peptide. Zum Vergleich wurde Färbung mit Ninhydrin-Reagens (0,3% Ninhydrin, 3% Collidin, 10% Eisessig in Äthanol) durchgeführt. Die Chromatogramme wurden bei -20°C aufbewahrt.

c) Spaltung ribosomaler Proteine mit Staphylococcus-aureus-Protease V8

Hierzu wurde nach der von Houmard und Drapeau (99) beschriebenen Methode verfahren. Die verwendete Protease hatte eine spezifische Aktivität von 500 U/mg.

d) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung tryptischer Peptide

Die von jeweils 3 Dünnschichtplatten mit einem Spatel ausgekratzten Peptide wurden zweimal mit 50% Essigsäure extrahiert, anschließend getrocknet und 20 Stunden bei 110°C mit 100 μl konstant siedender HCl, der 0,2% Mercaptoäthanol und 0,2% Phenol zugesetzt war, hydrolysiert. Hierzu wurden die Hydrolyseröhrchen 30 sec mit Stickstoff begast und sofort unter Vakuum zugeschmolzen. Das Hydrolysat wurde in 100 μl Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen und durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 100 000 g von partikulären Verunreinigungen befreit. Von der nun klaren Peptidlösung wurden 50 μl in einem Aminosäureanalysator (Biotronik LC 6001) auf die Aminosäurezusammensetzung des betreffenden Peptids untersucht. Zum Vergleich diente ein Standard aus allen 20 Aminosäuren in stöchiometrischem Verhältnis. Die Absorption der Ninhydrin-Aminosäuren bei 560 nm und 440 nm wurde parallel aufgezeichnet

e) Bestimmung der Aminosäuresequenz von tryptischen Peptiden

10-20 nMol tryptisches Peptid wurden, wie im letzten Abschnitt beschrieben, extrahiert und durch Ultrazentrifugation geklärt. Die Sequenzierung der Peptide erfolgte nach der von Chang et al (100) beschriebenen Methode. Jeder Sequenzierungsschritt vollzog sich in 3 Stufen:

1. Kopplung von 4-N,N-Dimethylaminobenzol-4'-Isothiocyanat (DABITC) und Phenylisothiocyanat (PITC) an das Peptid. Überschüssiges Reagens wurde durch Extraktion mit n-Heptan/Äthylacetat (2:1) entfernt.
2. Abspaltung der N-terminalen Aminosäure mit Trifluoressigsäure und Extraktion mit Butylacetat.
3. Konversion der abgespaltenen Thiazolinon-Aminosäure zur Thiohydantoin-Aminosäure (DABTH-Aminosäure) mit 50%iger Trifluoressigsäure. Die Identifizierung der DABTH-Aminosäuren erfolgte über Dünnschichtchromatographie mit Eisessig/Wasser (1:2) als Laufmittel für die 1. Dimension und Toluol/n-Hexan/Eisessig (3:1:1) als Laufmittel für die 2. Dimension. Dazu wurden 2,5 x 2,5 cm große Micropolyamid-Fertigfolien (Schleicher & Schüll) verwendet. Als Referenz wurde DABTC-Diäthylamin aufgetragen. Aus ihrer Lage relativ zum Referenzfleck und zum Auftragspunkt konnten die Aminosäuren bestimmt werden.

15. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der von Ehresmann et al (101) beschriebenen Methode spektrophotometrisch bestimmt.

16. Chemikalien und Bezugsquellen

$[^3\text{H}]$ -Cycloheximid war ein Geschenk der Upjohn Co. (Kalamazoo, Michigan). Bezugsquellen für Antibiotika waren: Emetin und Cycloheximid: Serva (Heidelberg); Anisomycin: D. Vazquez (Madrid); Verrucarin: Sandoz (Basel); Trichodermin: Leo Pharmaceuticals (Ballerup); Hygromycin B: Eli Lilly & Co (Indianapolis, Indiana). $[^{14}\text{C}]$ -Aminosäuren und $[^3\text{H}]$ -Uracil wurden von Amersham Buchler bezogen. ATP, GTP, Kreatinphosphat, Kreatinphosphat-Kinase und tRNS lieferte Boehringer, Mannheim. Saccharose und Ammoniumsulfat, beide ultrapur, wurden bei Schwarz & Mann (Orangeburg, USA) gekauft.

Alle anderen Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A. Die Chemikalien für die Proteinochemie wurden, soweit nötig, nach den beschriebenen Empfehlungen 1 bis 2 mal destilliert.

C. ERGEBNISSE

I. Isolierung und Charakterisierung temperatur- und kälte-sensitiver Mutanten

1. Isolierung von Mutanten nach EMS-Mutagenese

Von *Saccharomyces cerevisiae* A364A wurden insgesamt 148 kälte- und 252 temperatursensitive Mutanten isoliert und analysiert. 25% dieser Stämme erwiesen sich als atungsdefekte (Petite-) Mutanten, da sie auf YPG-Platten, die Glycerin als nicht-fermentierbare C-Quelle enthalten, nicht zu wachsen vermögen. Diese Stämme bilden auf YPAD-Agar bei 26°C nur kleine ("petite") Kolonien. Sie wurden nicht weiter untersucht.

Weiterhin weisen 40% aller Mutanten eine hohe Reversionsrate auf und eignen sich deshalb nicht für eine nähere Charakterisierung. Stämme, die nur partiell temperatur- bzw. kältesensitiv sind, also bei 36°C bzw. 15°C noch schwaches Wachstum zeigen, wurden ebenfalls nur verwendet, wenn sie bei 26°C Wildtyp-ähnliches Wachstum entwickelten. 20 temperatursensitive Mutanten hatten eine zusätzliche Auxotrophie erworben und in einem weiteren Fall konnte eine vom ts-Phänotyp unabhängige Suppressor-mutation nachgewiesen werden. Mit stillen bzw. unentdeckten zusätzlichen Mutationen ist demnach auch in den anderen Mutanten zu rechnen. An dieser großen Zahl von Mutanten wurden nun eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt, mit Hilfe derer mögliche Proteinsynthese-Mutanten ausgewählt werden sollten.

2. Phänotypische Suppression von ts-Mutationen

a) Suppression durch hohe Salzkonzentration

Osmotische Suppression wurde für auxotrophe Hefemutanten (102) und Proteinsynthesemutanten von *E.coli* gefunden (103).

Die Methode eignet sich dazu, Mutanten mit (osmotisch nicht suppressibaren) physiologischen Defekten, die Membran- oder Transportfunktionen betreffen, von möglichen Proteinsynthesemutanten zu unterscheiden (102).

Alle temperatursensitiven Mutanten wurden deshalb auf YPAD-Platten, die mit 1 M KCl supplementiert waren, zur Kontrolle auf YPAD-Platten ohne KCl, ausgestrichen und bei restriktiver Temperatur inkubiert. 30% der Stämme (43 von 150) zeigten nach 4 Tagen deutliches Wachstum auf den supplementierten Platten, sind also osmotisch suppressibel.

b) Suppression durch hohe Aminosäure-Konzentrationen

Für eine Reihe von Mutanten mit temperatursensitiven Aminoacyl-tRNS-Synthetasen in E.coli wurde eine Stabilisierung durch ihre Substrate in vivo nachgewiesen (104). Da Suppression durch Aminosäuren deshalb ein Indiz für einen Defekt in diesen Enzymen darstellt, wurde das Wachstum der temperatursensitiven Stämme in Gegenwart aller 20 Aminosäuren in einer Konzentration von je 2 mg/ml untersucht. Dabei wurde in 17 von 150 Mutanten die Temperatursensitivität supprimiert. 11 davon sind auch durch 1 M KCl suppressibel.

Als nächstes wurde versucht, Suppression durch eine einzelne Aminosäure zu erreichen. Keine der 17 Mutanten vermochte jedoch in Gegenwart von einer der 20 Aminosäuren in einer Konzentration von 2 mg/ml zu wachsen. Dies deutet darauf hin, daß das Aminosäuregemisch eher einen osmotischen als einen spezifischen Einfluß als Substrat für ein Enzym ausübt.

3. Bestimmung der Protein- und RNS-Syntheserate bei restriktiver Temperatur

Ein Proteinsynthesedefekt läßt sich durch die in vivo Bestimmung der Einbaurrate radioaktiv markierter Aminosäuren nachweisen.

Die gleichzeitige Messung der RNS-Synthese ermöglicht eine Differenzierung solcher Mutanten. Insgesamt wurden 55 temperatur- und 5 kältesensitive Mutanten, darunter die phänotypisch suppressibaren, im Doppelmarkierungs-Experiment untersucht.

Abb.1 zeigt die Ergebnisse für einige repräsentative Mutantentypen.

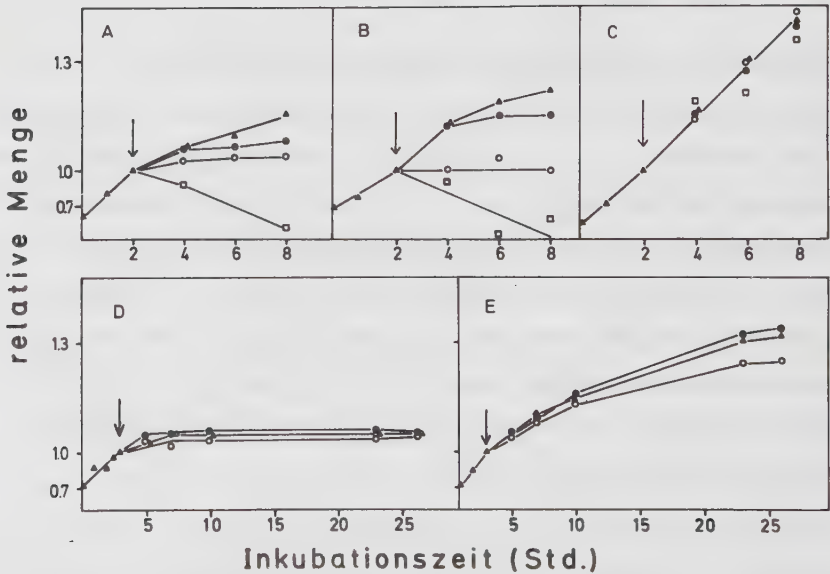


Abbildung 1: Einbau von $[^3\text{H}]$ -Uracil und $[^{14}\text{C}]$ -L-Lysin durch Zellen von ts67 (A), ts25 (B), Wildtyp A364A (C,E) und cs32 (D). Der Zeitpunkt des Temperaturwechsels von 26°C auf 36°C (A-C) bzw. 15°C (D,E) ist mit einem Pfeil markiert. O: $[^3\text{H}]$ -Uracil-Einbau; ●: $[^{14}\text{C}]$ -L-Lysin-Einbau; Δ : A₅₄₆; □: überlebende Zellen

ts67 ist eine von 6 temperatursensitiven (darunter auch ts13 und ts181, siehe unten), cs32 eine von 3 kältesensitiven Proteinsynthesemutanten. Weiter wurden 6 temperatursensitive RNS-Synthese-Mutanten, wie am Beispiel von ts25 dargestellt, gefunden. Dabei wurden als Proteinsynthesemutanten solche klassifiziert, in denen der Einbau von Leucin und Uracil innerhalb von 2 Stunden nach dem Temperaturwechsel (4 Stunden für kältesensitive Mutanten) sistiert bzw. danach nur noch geringfügig ansteigt. Im Gegensatz zu dieser stets koordinierten Hemmung der Protein- und RNS-Synthese ist in den RNS-Synthesemutanten nur der Einbau von Uracil gehemmt.

Bemerkenswert ist weiterhin, daß fast alle temperatursensitiven Protein- und RNS-Synthesemutanten konditional lethal sind, wie aus der Abnahme der Lebendzellzahl nach dem Temperaturwechsel hervorgeht. Die kältesensitiven Stämme werden dagegen bei der für sie restriktiven Temperatur lediglich im Wachstum gehemmt.

4. Bestimmung temperatursensitiver Aminoacyl-tRNS-Synthetase-Mutanten

Zur Analyse des Defekts der Proteinsynthesemutanten wurde der S100 Extrakt von 21 temperatursensitiven Mutanten im Aminoacylierungstest auf die Aktivität der Aminoacyl-tRNS-Synthetasen für 17 Aminosäuren untersucht. Dabei wiesen 2 Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigte tRNS-Beladungsrate auf, nämlich ts13 für Prolin und ts181 für Valin.

Abb. 2 zeigt die Kinetik der Aminoacylierung von tRNS durch die Enzyme ProRS und ValRS im S100 Extrakt des Wildtyps und der beiden Mutanten. Beide Mutantenenzyme erwiesen sich sowohl bei 36°C als auch bei 26°C als inaktiv, zumindest unter den vorliegenden Testbedingungen.

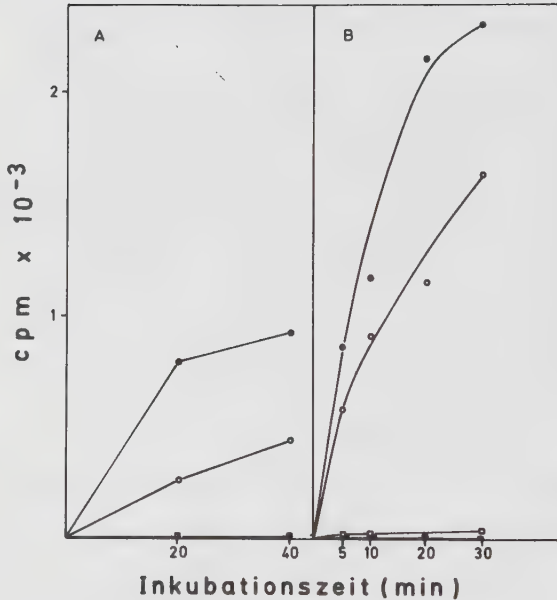


Abbildung 2:

Kinetik der tRNS-beladung mit $[^{14}\text{C}]$ -L-Prolin (A) und $[^{14}\text{C}]$ -L-Valin im Aminoacylierungstest (B).

●: WT, 36°C;

○: WT, 25°C;

□: ts13 (A) bzw.

ts181 (B), 36°C;

■: ts13 (A) bzw.

ts181 (B), 25°C.

1 000 cpm entsprechen einer tRNS-Beladung mit 50 pMol der jeweiligen Aminosäure.

Zur Kontrolle wurde die Aktivität der Phenylalanyl-tRNS-Synthetase der Mutanten gemessen. Sie lag in der Größenordnung der Aktivität des Wildtyps.

Da die ProRS-Aktivität im Vergleich zu der anderer Aminoacyl-tRNS-Synthetasen im S100 Extrakt aller untersuchten Stämme einschließlich des Wildtyps relativ niedrig war (200 bis 800 cpm wurden gemessen), wurden steigende Mengen an S100 Extrakt bis zu einer Proteinkonzentration von 200 µg pro Test (36°C) eingesetzt. Während sich damit die Beladungsaktivität des Wildtyp-extrakts um das vierfache steigern ließ, konnte im Extrakt von ts13 keine Aktivitätserhöhung nachgewiesen werden.

5. Sedimentationsverhalten von Mutanten-Ribosomen

Um einen möglichen Defekt in der Ribosomen-Assembly nachzuweisen, wurden Ribosomen von kältesensitiven Proteinsynthese-Mutanten, die bei 26°C angezogen und weitere 4 Stunden bei 15°C inkubiert worden waren, unter dissozzierenden und nicht-dissozzierenden Bedingungen in Saccharosegradienten zentrifugiert. Es konnten jedoch weder qualitative noch quantitative Abweichungen des Sedimentationsprofils der Ribosomen von dem des Wildtyps beobachtet werden.

II. Untersuchungen an Aminoacyl-tRNS-Synthetase-Mutanten

1. Genetische Analyse der vas-x1 Mutation

a) Untersuchung des Zusammenhangs zwischen ValRS-Defekt und Temperatursensitivität

Zur Untersuchung, ob Temperatursensitivität des Wachstums ihre Grundlage in der Mutation des ValRS Strukturgens besitzt, wurde Stamm Vl-4C mit dem Wildtyp gekreuzt und die Sporen von 4 Tetraden auf Segregation der Temperatursensitivität und der defekten ValRS analysiert. Es zeigte sich, daß die beiden Phänomene in allen Fällen gemeinsam 2:2 segregierten.

Einen eindeutigen Nachweis, daß Temperatursensitivität des Wachstums und Veränderung der ValRS die gleiche genetische Basis besitzen, lieferte die Analyse von "Revertanten". Die Mehrzahl der Stämme, die bei 37°C Wachstumsvermögen zeigten (z.B. 181-5) war zwar ohne meßbare ValRS-Aktivität, in einigen jedoch (z.B. 181-16) konnte eine partielle ValRS-Aktivität nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Valyl-tRNS-Synthetase-Aktivität von S100 aus ts181 und Derivaten. Die Testansätze, (100 µl) enthielten S100 in einer Konzentration von 50 µg/ml Protein und 30% Glycerin bei ansonsten gleicher Zusammensetzung wie in Material und Methoden beschrieben und wurden 30 min bei 25°C inkubiert.

Stamm	cpm	spez. Aktivität [pMol/mg.min]	relative Aktivität +) %
A364A	630	21,3	100 (100)
ts181	0	0	0
V1-4C	10	0,6	1 (1)
V1-6B	30	1,0	5 (3)
V1-4C x A364A	230	7,7	37 (30)
V1-6B x Y166	320	10,7	51 (37)
181-5	0	0	0
181-16	140	4,7	22 (22)

+) In Klammern sind die relativen Aktivitäten der ValRS geteilt durch die jeweilige Phenylalanyl-tRNS-Synthetase-Aktivität angegeben.

Die ValRS-Aktivität der heterodiploiden Stämme V1-4C x A364A und V1-6B x Y166 betrug, wie zu erwarten war, annähernd die Hälfte der Aktivität im Wildtyp. Sie reichte aus, um Wachstum dieser Stämme bei 37°C zu gewährleisten. Die Temperatursensitivität der ValRS-Mutanten ist also ein rezessives Merkmal.

b) Versuch einer Kartierung des vas-x1 Gens

Erste Versuche, Kopplung des vas-x1-Gens in Stamm ts181 mit anderen Genorten mit Hilfe der Tetradenanalyse nachzuweisen, führten für mehrere Auxotrophien zu abnormalen Segregationsmustern, die auf die Anwesenheit eines Suppressors hindeuteten.

Tatsächlich stellte sich heraus, daß ts181 im Gegensatz zum Wildtyp tyr^+ und lys^+ ist, und zwar durch Suppression der entsprechenden Mutantenallele, da sich diese wieder herauskreuzen ließen. Aus der dazu durchgeführten Kreuzung resultieren die Stämme V1-4C und V1-6B (vas-x1 , ohne Suppressor).

Damit wurden 3 Kreuzungen durchgeführt und die so gebildeten diploiden Stämme zur Ascosporenbildung angeregt. Die Analyse der Tetraden (durchschnittlich 70) führte zu folgenden Ergebnissen:

- Das vas-x1 Gen ist nicht Centromer-gekoppelt. Dies ergibt sich aus der Segregation von 5 Centromer-gekoppelten Mutantengen im Verhältnis zur Segregation des vas-x1 Gens. Das P:N:T Verhältnis (elterliche: nichtelterliche:Tetratyp-Vererbung) betrug jeweils annähernd 1:1:4, wie es für eine Nicht-Kopplung zwischen Genen bzw. zwischen Gen und Centromer zu erwarten ist.
- Weitere 11 Gene auf 8 Chromosomen zeigten keine Kopplung mit dem vas-x1 Allel. In keinem Fall wich das Verhältnis P:N:T von dem für Nicht-Kopplung signifikant ab.
- Kreuzungen von vas-x1 - mit ils1 - und mes1 -Mutanten führten zu diploiden Stämmen, die neben morphologischen Veränderungen auch einen Defekt in der Ascosporen-Bildung aufwiesen. Aus diesem Grund konnte auch nicht festgestellt werden, ob eine Kopplung zwischen vas-x1 und einem der beiden kartierten Gene für eine Aminoacyl-tRNS-Synthetase vorliegt.

2. Isolierung und Charakterisierung von Revertanten

Die vier für *Saccharomyces* verfügbaren Aminoacyl-tRNS-Synthetase-Mutanten boten sich für die Isolierung weiterer Proteinsynthesemutanten an (105).

Dazu wurden zunächst Derivate dieser Mutanten von komplementärem Paarungstyp hergestellt. Die Mutantenstämme von beiden Paarungstypen wurden dann zur Selektion von insgesamt 300 unabhängigen spontan temperaturresistenten "Revertanten" verwendet. 59 davon, die sich durch langsames Wachstum bei 26°C vom jeweiligen Mutterstamm unterschieden, wurden weiter wie folgt charakterisiert:

- Durch Rückkreuzung wurde der Allelzustand der "Reversion" in 50% der Fälle als dominant bzw. rezessiv bestimmt. Dabei deutet Rezessivität eher auf eine extragenische Suppression als auf eine Reversion hin. Da zudem von ribosomalen Suppressoren angenommen werden kann, daß sie rezessiv oder semidominant und nicht dominant sind (49), beschränkten sich die weiteren Untersuchungen auf die rezessiven "Revertanten" bzw. "Suppressoren".
- Je 20 rezessive Suppressoren vom Paarungstyp a wurden mit solchen vom α -Typ gekreuzt. Das Wachstumsverhalten der erhaltenen diploiden Stämme bei 37°C gab Aufschluß darüber, ob sich die Suppressor-Mutationen der Kreuzungspartner komplementierten oder nicht. Auf diese Weise konnten die getesteten Stämme 3 Komplementationsgruppen zugeordnet werden.

- 5 Revertanten erwiesen sich als Kältesensitiv, möglicherweise aufgrund einer ribosomalen Mutation, die nicht nur zur Suppression der Temperatursensitivität führt, sondern auch die Assembly der Ribosomen beeinträchtigt. In entsprechenden Stämmen von E.coli konnten veränderte ribosomale Proteine nachgewiesen werden (11).
- Von 10 Suppressoren wurde ribosomales Protein isoliert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Punkt IV,1). Veränderte Proteine konnten jedoch nicht festgestellt werden.

III. Isolierung und Charakterisierung Antibiotika-resistenter Mutanten

1. Isolierung der Mutanten

Die bisher beschriebene experimentelle Annäherung hat zwar Stämme geliefert, für die eine Mutation in ribosomalen Komponenten wahrscheinlich ist, jedoch keine biochemisch identifizierbaren. Als nächstes Verfahren wurde deshalb die Isolierung Antibiotika-resistenter Mutanten gewählt.

Eine Voraussetzung für die Selektion Antibiotika-resistenter Mutanten ist dabei die Kenntnis der MHK-Werte für die verwendeten Antibiotika. Als MHK ist diejenige Konzentration definiert, die gerade noch zu einer Hemmung des Testorganismus führt. Zu ihrer Bestimmung wurde das Wachstum der Wildtypstämme A364A, Y166 und DX1 auf YPAD-Platten in Gegenwart steigender Antibiotika-Konzentrationen analysiert.

Nur Emetin hatte selbst in einer Konzentration von 1 g/l (höchste getestete Konzentration) keinen Effekt auf das Wachstum der Stämme, obwohl in vitro Sensitivität nachzuweisen war (siehe Punkt IV,5).

Selektion auf Resistenz gegen die 10-fache MHK, (für Cycloheximid zusätzlich gegen die 4-fache und 100-fache MHK) sowohl spontan als auch nach Mutagenese, führte zur Isolierung von 5 Anisomycin-, 10 Trichodermin-, 23 Verrucaridin- und 87 Cycloheximid-resistenten Mutanten der Wildtypstämme A364A, Y166 und DX1. Die Selektion auf HygromycinB-Resistenz verlief ohne Erfolg. Von Verrucaridin enthaltenden Platten wurden nur relativ große Kolonien abisoliert, da die Zahl der gewachsenen Kolonien in allen Fällen hoch war.

2. Charakterisierung Cycloheximid-resistenter Mutanten

Von den isolierten Mutanten wurden vorrangig die Cycloheximid-resistenten Stämme charakterisiert, da dieses Antibiotikum aus verschiedenen Gründen besonderes Interesse verdient (siehe Einleitung).

a) Bestimmung der in vivo Resistenz

Als Maß für die in vivo Resistenz dienten die MHK-Werte, die wie oben beschrieben bestimmt wurden. Sie reichten bis 200 µg/ml Cycloheximid. Mutanten mit geringeren Werten als 5 µg/ml wurden nicht weiter berücksichtigt, da in diesem Konzentrationsbereich Effekte des genetischen "Hintergrunds" auf die in vivo Resistenz eine Rolle spielen können. Es wurde nämlich festgestellt, daß cyh⁺ Sporen aus einer Kreuzung zwischen zwei Wildtypstämmen eine Schwankung der MHK-Werte von 0,25 bis 1,0 µg/ml aufweisen.

Für hochresistente Mutanten ($\text{MHK} > 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$) wurde als MHK diejenige Cycloheximid-Konzentration bezeichnet, die gerade zu einer deutlichen Wachstumsschwächung führt, wobei ein Vielfaches dieser Konzentration noch schwaches Wachstum zulassen kann. In einem Fall konnte sogar in Gegenwart von Cycloheximid in einer Konzentration von $1\,000 \text{ } \mu\text{g/ml}$ noch Koloniebildung festgestellt werden. Eine Abhängigkeit der Mutantentypen von der für die Selektion verwendeten Konzentration zumindest auf der Ebene der MHK-Werte wurde nicht beobachtet, da hochresistente Mutanten sich durch Selektion gegen $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ebenso gut wie gegen $25 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Cycloheximid gewinnen ließen.

b) Bestimmung der Resistenz in heterodiploiden Stämmen

Zur Bestimmung des Allelzustands der Resistenzgene wurden nun 64 Mutanten mit den Wildtypstämmen Y166 und DX1 rückgekreuzt. Die MHK-Werte der heterodiploiden Kreuzungsprodukte lagen in 58 Fällen in dem für den Wildtyp gemessenen Bereich oder geringfügig darüber. Die entsprechenden Mutanten-Phänotypen sind demnach rezessiv. In den restlichen 6 Fällen entspricht die MHK der heterodiploiden Stämme derjenigen der haploiden Mutanten, die Resistenz ist also hier dominant. Auffallenderweise handelt es sich dabei fast ausschließlich um niedrigresistente Mutanten ($\text{MHK: } 5 \text{ bis } 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$).

c) Untersuchungen zur Komplementation der Cycloheximid-Resistenz

Die Anzahl der beteiligten Resistenzgene wurde durch Komplementation für 15 resistente Derivate des Wildtyps A364A bestimmt.

Diese wurden dazu mit der cyh2-Mutante XS144-S22 gekreuzt, für die eine ribosomale Ursache der Resistenz beschrieben worden ist (74). Da die verwendeten Kreuzungspartner bezüglich der Resistenz rezessiv sind, sollten nur Resistenzgene derselben Komplementationsgruppe Wachstum der mischresistenten Diploiden in Anwesenheit des Antibiotikums ermöglichen. Dies traf auf 14 von 15 untersuchten Mutanten zu (darunter cy32, siehe unten). Kreuzungen weiterer 16 resistenter Derivate der Stämme Y166 und DX1 untereinander bzw. mit den Mutanten cy32 und cy3D, einem Derivat der Mutante cy32 vom Paarungstyp α , führten zu einem ähnlichen Ergebnis: Bis auf eine Ausnahme konnten diese Mutanten derselben Komplementationsgruppe wie die Stämme cy32 bzw. cy3D und folglich auch XS144-S22 (siehe oben) zugeordnet werden. Sie tragen demnach Mutationen im cyh2-Gen.

IV. Charakterisierung von Cycloheximid-resistenten Mutanten mit verändertem ribosomalem Protein

1. Auftrennung der ribosomalen Proteine durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine Auswahl der Cycloheximid-resistenten Mutanten wurde nun direkt auf veränderte ribosomale Proteine untersucht. Zahlreiche Methoden zur zweidimensionalen Auftrennung ribosomaler Proteine wurden beschrieben. Sie sind im wesentlichen auf die Methoden von Mets und Bogorad (85, System A) und Kaltschmidt und Wittmann (86, System B) zurückzuführen. Eine Kombination dieser beiden Systeme mit einigen Änderungen wurde kürzlich von Geyl et al (87, System C) beschrieben.

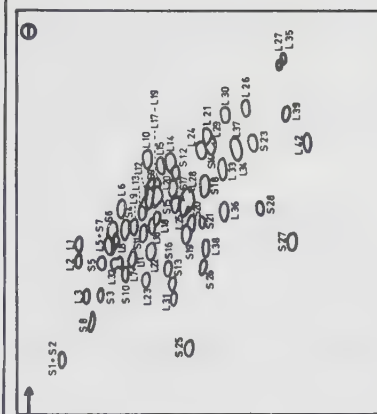
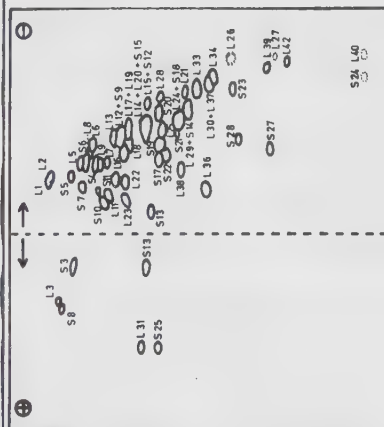
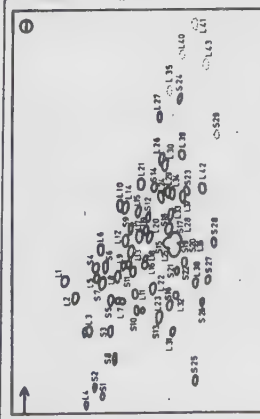
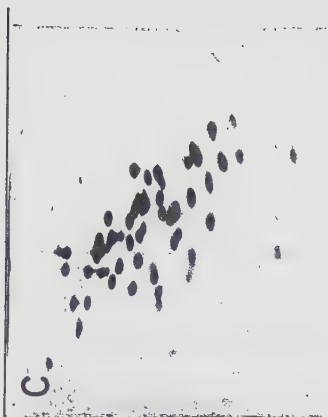
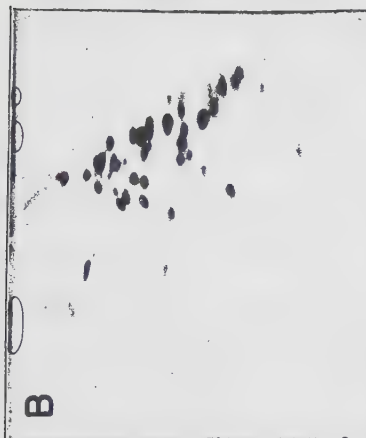
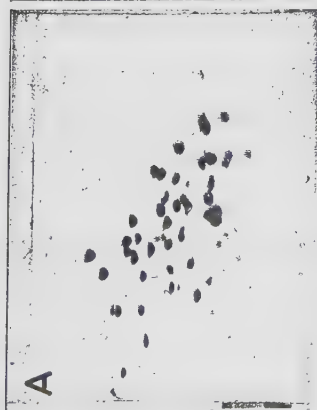


Abbildung 3: Auftrennung 80S-ribosomaler Proteine von *Saccharomyces cerevisiae* A364A über zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach System A (A), System B (B) und System C (C). Die Proteine wurden, wie im Text erläutert, nummeriert, jedoch ohne den Zusatz Y.

a) Vergleich der verschiedenen Elektrophoresesysteme

Zunächst wurde untersucht, welches Elektrophoresesystem die beste Auftrennung ribosomaler Proteine aus Hefe gewährleistet. Abb. 3 zeigt die nach System A, B und C aufgetretenen 80S-ribosomalen Proteine aus Wildtypzellen von *S. cerevisiae*.

Zur Erleichterung der Identifizierung wurden die Proteine in der 1. Dimension nach System A und C bzw. in der 2. Dimension nach System B und C jeweils parallel aufgetrennt. Die Numerierung der Proteine erfolgte nach der von Otaka und Osawa (106) vorgeschlagenen Nomenklatur. Tabelle 3 gibt eine vergleichende Darstellung der Auftrennbarkeit 80S-ribosomaler Proteine.

Daraus geht hervor, daß die Zahl nichtidentifizierter bzw. nicht-identifizierbarer, auf Standardgelen nicht sichtbarer oder überlappender Proteinflecken für das System B am höchsten ist. Systeme A und C haben folgende Vorteile:

- hohe Reproduzierbarkeit
- keine oder unbedeutende Zurückhaltung von Proteinen beim Einwandern in Gele der 1. Dimension; daher geringe Schwankung der Intensität der Flecken
- die verschiedenen Formen phosphorylierter Proteine wandern im System A und C in die gleiche Position

Tabelle 3: Vergleich der Auftrennbarkeit 8oS-ribosomaler Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nach drei Systemen (siehe Material und Methoden).

Kriterium	System A	System B	System C
Nicht auftrennbar	L44	-	L44
Nicht identifiziert ¹⁾ -		L4, L35, L41, L43 S1, S2, S16, S26 S29	-
Auf Standardgelen nicht oder kaum sichtbar ²⁾	L35, L40, L41, L43 S29	L10, L26, L27, L32, L40, L44 S24	L40, L41, L43 S24, S29
Überlappende Proteine ³⁾	L25-L28-L36- S15-S17-S19- S20 L23-S13 L26-L30	L1-L2 L5-L8-S6 L9-S4 L12-S9 L17-L19 L14-L20-S15 L15-S12 L24-S18 L29-S14 L30-L34-L37	L5-L8-S6-S7 L9-S4 L12-L17-L19-S9 L25-L28-S17- S19-S20 L27-L35 L34-L37

1) nach (106)

2) Die genannten Proteine können durch Erhöhung der aufgetragenen Proteinmenge bzw. Änderung der Laufzeiten aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

3) Überlappung kann zum Teil durch Verändern der Gelstärke bzw. der Laufzeiten aufgehoben werden.

- die oxidierbaren Proteine liegen nur in der reduzierten Form vor (Verwendung von Dithiothreitol bzw. Mercaptoäthanol im Auftragspuffer).

- nichtidentifizierbare Zusatzflecken (z.B. durch Modifikation während der Elektrophorese) treten selten auf.

Dagegen bietet sich System B für die Auftrennung der verschiedenen Formen des sauren Proteins YL44 oder der Proteine YL25, YL28, YL36, YS15, YS17, YS19 und YS20 an, die in System A und z.T. in System C nur unvollständig getrennt werden.

Für das Screening der Mutanten wurde Methode A gewählt, da sie sich gegenüber Methode C durch einen kürzeren Zeitbedarf und die geringere Zahl überlappender Proteine auszeichnet.

b) Elektrophoretisches Verhalten der veränderten ribosomalen Proteine

Die Auftrennung ribosomaler Proteine aus 52 temperatur- und kältesensitiven Mutanten sowie 10 Suppressor-Stämmen (siehe Punkt III.2.) führte zu Proteinmustern, die mit dem des Wild-typs A364A vollständig übereinstimmten. Dagegen befanden sich unter 22 Antibiotika-resistenten Mutanten 4 mit einem veränderten ribosomalen Protein. Es handelt sich um die Cycloheximid-resistenten Stämme cy32, sp1, SR17 und 200-1 (MHK 150, 5, 50 bzw. 200 µg/ml), die alle eine Veränderung des Proteins YL24 aufweisen (Abb.4).

Nach dem elektrophoretischen Verhalten sind 2 Mutanten-Formen des Proteins zu unterscheiden, nämlich eine mehr basische, d.h. in der 1. Dimension schneller in Richtung Kathode wandernde, in den Stämmen cy32, SR17 und 200-1, und eine mehr saure Form in der Mutante sp1. Da der Stamm 200-1 ein höherresistentes Derivat der Mutante SR17 ist, sich jedoch im ribosomalen Proteinmuster in keiner Weise davon unterscheidet, beruht die Steigerung der Resistenz im zweiten Mutationsschritt möglicherweise auf der Veränderung einer anderen Zellkomponente bzw. Funktion, z.B. der Aufnahme des Antibiotikums.

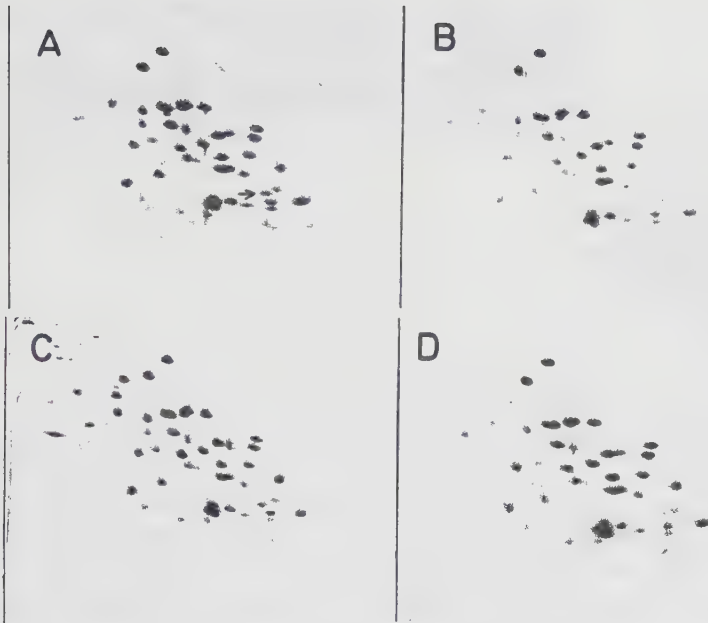


Abbildung 4: Vergleich des ribosomalen Proteinmusters von 80S-Ribosomen aus *Saccharomyces cerevisiae* A364A (A), cy32 (B), sp1 (C) und SR17 (D) nach zweidimensionaler Auftrennung im System A (nach Mets und Bogorad). Die Position des Proteins YL24 ist mit Pfeil gekennzeichnet.

Neben dem unterschiedlichen Laufverhalten der mutierten Proteine in der 1. Dimension, das auf eine Veränderung der Ladung zurückzuführen ist, zeigen sich auch in der 2. Dimension (Auftrennung vorzugsweise nach Größe) Unterschiede. Dies kommt besonders bei der eindimensionalen Elektrophorese nach Laemmli (83) zum Ausdruck (Abb.5).

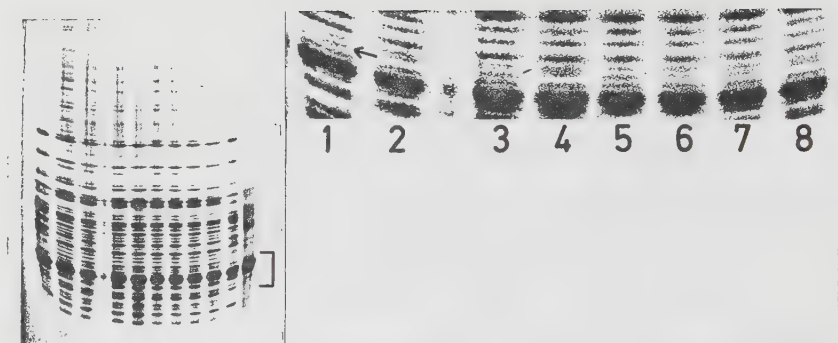


Abbildung 5: Eindimensionale Auftrennung der 80S-ribosomalen Proteine von den Stämmen A4860D(1), SR17(2), sp1(3), cy32(4), sp1 x A4860D(5), sp1 x cy3D(6), cy32 x Y166(7) und SR17 x cy32(8) nach Laemmli. Das Gel (10-25% Polyacrylamid-Gradient) hatte die Abmessung 0,1 x 13 x 25 cm. Die Position des Wildtyp-Proteins YL24 ist in der vergrößerten Darstellung des entsprechenden Gelausschnittes mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Hier wandert die mehr basische YL24-Form der Mutante cy32 langsamer als das Wildtyp-Protein und könnte damit ein höheres Molekulargewicht signalisieren. Die mehr saure Form der Mutante sp1 dagegen wandert im SDS-Gel, wenn auch nicht so deutlich erkennbar, schneller als das Wildtyp-Protein. Die Veränderung im Fall der mehr basischen Mutantenform des Proteins YL24 reicht dabei aus, um eine rasche Untersuchung sehr vieler Stämme, z.B. Rekombinanten, mit Hilfe der eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese zu ermöglichen. Wie später gezeigt wird, beruht jedoch das veränderte Wanderungsverhalten beider Mutantenformen nicht auf einer Zu- oder Abnahme des Molekulargewichts gegenüber der Wildtyp-Form des Proteins.

Durch Auftrennung der Proteine aus gereinigten 40S- und 60S-Fraktionen nach den beschriebenen Methoden für die zweidimensionale Gelelektrophorese konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß das veränderte Protein ein Bestandteil der 60S-ribosomalen Untereinheit ist (Abb.6).

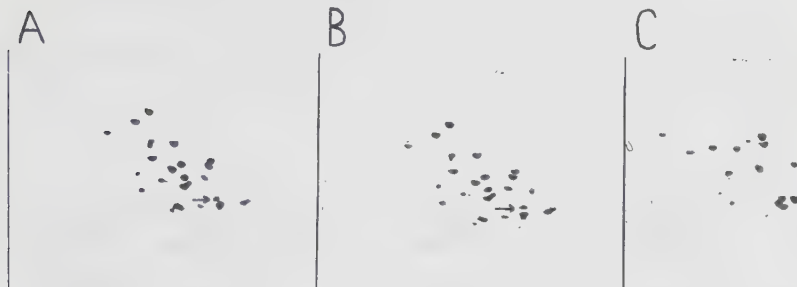


Abbildung 6: Auftrennung ribosomaler Proteine der 60S-ribosomalen Proteine vom Wildtyp A364A (A) und von der Mutante cy32 (B), sowie der 40S-ribosomalen Proteine vom Wildtyp (C). Das Protein YL24 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

c) Nachweis der YL24-Proteine in heterodiploiden Stämmen

Es gibt zwei Möglichkeiten, die Veränderung des Proteins YL24 zu erklären, nämlich einmal über eine Mutation des Strukturgens und zum anderen über eine Mutation im Gen für ein das Protein YL24 modifizierendes Enzym. Der elektrophoretische Nachweis beider Proteinformen nebeneinander in einem diploiden Stamm, der heterozygot für das Resistenzgen ist, könnte dabei den Beweis für eine Strukturgen-Mutation liefern.

Abb. 7 zeigt Ausschnitte aus den Elektropherogrammen von ribosomalen Proteinen verschiedener haploider und heterodiploider Stämme. Die Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit der drei Proteinformen sind zwar zu gering, ihre Identifizierung als getrennte Flecken bzw. Banden in einem Gel bestimmen zu lassen; die Ausprägung einer verbreiterten Bande (z.B. sp1 x cy3D und cy32 x Y166; Abb.5) bzw. eines in die Länge gezogenen Flecks

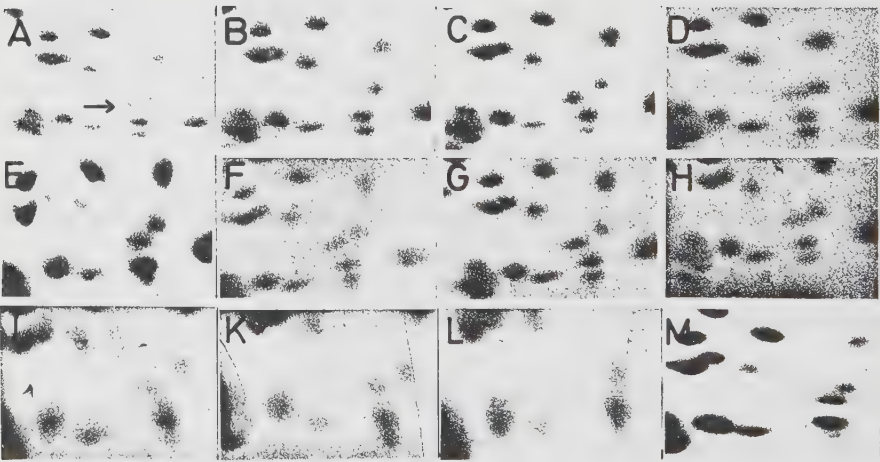


Abbildung 7: Ausschnitte der zweidimensionalen Elektropherogramme (System A) ribosomaler Proteine aus haploiden und diploiden Stämmen. A: A364A, B und M: cy32, C: sp1, D: SR17, E: cy3D x A364A, F: sp1 x cy3D, G: sp1 x A4860D (WT), H: SR17 x A364A, J: A364A x Y166, K: cy32 x Y166, L: cy32 x cy3D

in der entsprechenden Position (z.B. sp1 x cy3D; Abbildung 7) weist jedoch auf die Ausprägung und den Einbau jeweils beider Proteinformen in Ribosomen hin. Eine quantitative Aussage darüber läßt sich allerdings mit diesen Methoden nicht machen.

2. Genetische Untersuchungen

a) Segregationsanalysen

Zunächst sollte untersucht werden, ob Cycloheximid-Resistenz und die Veränderung des Proteins YL24 in den Stämmen cy32, sp1 und SR17 durch Mutation in einem oder in mehreren Genen hervorgerufen werden. Dazu wurden Tetraden aus heterodiploiden Stämmen (cyh/cyh⁺) auf ihre in vivo Resistenz auf YPAD-Platten, die mit 5µg/ml Cycloheximid supplementiert waren, und parallel dazu auf ihre ribosomalen Proteine mit Hilfe der eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese (cy32, SR17) bzw. der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach System A (sp1) untersucht. Es zeigte sich für alle Tetraden, nämlich 15 aus der Kreuzung cy32 x Y166, 9 aus SR17 x A364A und 4 aus sp1 x A4860D, daß die beiden genannten Phänomene gemeinsam segregieren; die Aufspaltung sensitive/resistente Sporen betrug in allen Fällen 2:2. Resistenz und Proteinveränderung sind demnach höchstwahrscheinlich auf einen einzigen Mutationsschritt zurückzuführen.

Da der Genort für die Cycloheximidresistenz des Stammes sp1 bis dahin noch nicht bestimmt worden war, wurde weiterhin eine Random-spore-Analyse von Sporen aus sp1 x SR17 (cyh/cyh2) durchgeführt. Alle 100 untersuchten Sporen konnten in Gegenwart von 2 µg/ml Cycloheximid wachsen. Es hat also keine Rekombination zwischen den cyh-Genen stattgefunden, was darauf hinweist, daß die mutierten Gene allelisch sind.

b) Kartierung des cyh-x32 Gens

Die Komplementations-Versuche haben gezeigt, daß sich die Mutanten cy32 und XS144-S22 bezüglich der Cycloheximid-Resistenz komplementieren. Dies deutete darauf hin, daß cyh-x32 und cyh2 Allele desselben Gens sind. Um einen eindeutigen genetischen Hinweis darauf zu bekommen, wurde nun zunächst untersucht, ob Rekombination zwischen den beiden Allelen möglich ist. Dazu wurden 35 Sporen aus der Kreuzung cy3D x XS144-S19 wie oben beschrieben analysiert. Es wurde gefunden, daß alle Sporen gegen 2 µg/ml Cycloheximid resistent sind. Es hatte demnach keine Rekombination zwischen den Resistenzgenen stattgefunden. Das Ergebnis der Sporenanalyse ist also im Einklang mit der aus der Komplementation gezogenen Schlussfolgerung, schließt jedoch die Möglichkeit nicht aus, daß die beiden Resistenzmutationen in benachbarten Genen liegen. Eine genauere Kartierung wurde nun mit Hilfe der Tetradenanalyse vorgenommen. Dabei wurden nur solche Tetraden berücksichtigt, in denen nicht mehr als 1 Merkmal anders als 2:2 aufspaltet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Abstände von cyh-x32 zu benachbarten Genen auf Chromosom VII L, angegeben in Centimorgan (cM). Die Zahl der zur Ermittlung der Abstände herangezogenen Tetraden ist angegeben. Die Literaturwerte für cyh2 sind in Klammern gesetzt.

Gen-Kopplung	Tetraden	Abstand cM	Analyse ⁺
leu1-trp5	72 (3315)	17,4 (17,6)	A
trp5-cyh-x32	97 (1937)	47,4 (42,5)	A
cyh-x32-met13	162 (1891)	13,3 (15,0)	A,B
met13-aro2	146 (664)	12,0 (13,7)	A
cyh-x32-aro2	154 (383)	25,0 (30,1)	A
cyh-x32-ts437	94 (25)	3,2 (0)	C
cyh2-cyh-x32	62	0	B

⁺ Für die Analysen wurden Tetraden-Sporen der Stämme cy32 x XSY6 (A), cy32 x XSY39 (B) und XSY6-32-1 x ts437 (C) untersucht.

Die Abstände zwischen den Genen in Centimorgan (cM) wurden nach (78) berechnet und in Abb. 8 am linken Arm des Chromosoms VII dargestellt.



Abbildung 8: Ausschnitt aus Chromosom VII von *S. cerevisiae*. Eingetragen sind nur Gene, die in dieser Arbeit zur Abstandsbestimmung herangezogen wurden. Die dazugehörigen Abstände sind in Tabelle 4 aufgeführt. —○— : Centromer.

Wie der Vergleich mit den Literaturwerten (61) zeigt, stimmt die Lage des cyh-x32-Gens mit der des cyh2-Gens überein. Die Unterschiede zwischen den gemessenen und den Literaturwerten sind offensichtlich statistischer Natur, da die Genauigkeit, mit der die Genabstände berechnet werden können, von der Zahl der untersuchten Tetraden abhängt.

Für das tsm437-Gen wurde ein Abstand von 3 cM zum cyh-x32-Gen bestimmt, der wahrscheinlich auch dem zum cyh2-Gen entspricht, da in 62 Tetraden keine Rekombination zwischen beiden cyh-Genen nachzuweisen war.

Die relative Lage der Gene cyh-x32 (bzw. cyh2) und tsm437 zueinander wurde nicht geklärt.

3. Untersuchungen zur Cycloheximid-Resistenz in vivo

a) Bestimmung der Resistenz in heterodiploiden Stämmen

Um die unter III.2.b als rezessiv beschriebene Resistenz gegen Cycloheximid näher zu charakterisieren, wurden als nächstes heterodiploide Stämme gegen eine Reihe fein abgestufter Antibiotikums-Konzentrationen auf Wachstum untersucht. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die MHK-Werte haploider und homo- bzw. heterodiploider Stämme. Daraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Tabelle 5: Minimale Hemmkonzentration (MHK) für Cycloheximid von verschiedenen haploiden und diploiden Hefestämmen.

Stamm	Genotyp	MHK ($\mu\text{g/ml}$)
A. Haploid:		
A364A	cyh ⁺	0,25
Y166	cyh ⁺	0,25-0,5
cy32	cyh-x32	100-200
cy3D	cyh-x32	100-150
XS144-S19	cyh2	2,5
XS144-S22	cyh2	5
B. Homozygot diploid:		
A364A x Y166	cyh ⁺ /cyh ⁺	0,25-0,5
cy32 x cy3D	cyh-x32/cyh-x32	100-150
XS144-S19 x XS144-S22	cyh2/cyh2	5
C. Heterozygot diploid:		
A364A x cy3D	cyh ⁺ /cyh-x32	1-2,5
cy32 x Y166	cyh-x32/cyh ⁺	2,5-5
A364A x XS144-S22	cyh ⁺ /cyh2	0,5-1
XS144-S19 x Y166	cyh2/cyh ⁺	0,25
cy32 x XS144-S22	cyh-x32/cyh2	7,5-10
XS144-S19 x cy3D	cyh2/cyh-x32	25-50

- Heterodiploide Stämme vom Genotyp cyh-x32/cyh⁺ sind um eine Größenordnung resistenter als der entsprechende haploide oder diploide Wildtypstamm, aber um fast 2 Größenordnungen sensitiver als die Resistenzmutante. Diese Erscheinung wurde als "Semi-dominanz" bereits für andere Cycloheximid-resistente Mutanten beschrieben (69, 73, 107).
- Ein Vergleich der MHK-Werte der zwei Wildtyp- bzw. heterodiploiden Stämme zeigt, daß der Grad der in vivo Resistenz, wie bereits erwähnt, vom genetischen Hintergrund der Zelle abhängt. Die Unterschiede sind jedoch zu gering, als daß Semidominanz damit erklärt werden könnte.

Der semidominante Phänotyp, der auch in der Kombination cyh2/cyh-x32 zum Ausdruck kommt, bestätigt die Resultate der Gelelektrophorese und zeigt, daß in diploiden Stämmen beide YL24-Proteinformen in intakte Ribosomen eingebaut werden.

b) Aufnahme von $[^3\text{H}]$ -Cycloheximid durch Wildtyp- und Mutantenzellen

Um das in vivo Resistenzverhalten mit den Ergebnissen der anschließenden in vitro Untersuchungen korrelieren zu können, war die Information notwendig, über welchen Mechanismus das Antibiotikum in die Zellen aufgenommen wird.

Für die Aufnahmeversuche wurde $[^3\text{H}]$ -Cycloheximid in einer Konzentration verwendet, in der es das Wachstum von Wildtypzellen gerade hemmt (0,5 µg/ml). Die in Vollmedium inkubierten Zellen zeigten dabei eine Zunahme der Radioaktivität um 130% von 450 auf 1020 cpm (Wildtyp A364A) bzw. um 30% von 450 auf 620 cpm (cy32). Ähnliche Werte lieferten weitere Experimente mit Zellen, die in YPAD- bzw. supplementiertem SD-Medium angezogen wurden.

Das aufgenommene $[^3\text{H}]$ -Cycloheximid ließ sich durch Zugabe eines 100-fachen Überschusses an nichtmarkiertem Cycloheximid innerhalb einer Minute bis auf einen Restwert von 200 bis 400 cpm auswaschen.

Die Ergebnisse lassen folgende Interpretationsmöglichkeiten zu:

- Eine aktive Aufnahme von Cycloheximid findet zumindest unter den getesteten Bedingungen nicht statt. Die gemessenen Werte liegen vielmehr im Bereich der für den Fall, daß die Hefezellhülle für das Antibiotikum frei permeabel ist, berechneten Radioaktivität.

- Die Zunahme der aufgenommenen Radioaktivität innerhalb der Inkubationszeit von 2 Stunden läßt sich mit einer durch Bindung des Antibiotikums an die Ribosomen herbeigeführten Gleichgewichtsverschiebung erklären. Dafür spricht auch der Unterschied in der Zunahme in Wildtyp- und Mutantenzellen.
- Die hohe Anfangsaktivität von 450 cpm könnte auf eine schnelle Bindung des Antibiotikums an die Hefezellwand und nachfolgende langsamere Aufnahme des Antibiotikums zurückzuführen sein.

4. Untersuchungen zur Cycloheximid-Resistenz in vitro im PolyU-abhängigen System

a) Abhängigkeit der Aktivität nativer Ribosomen von der Cycloheximid-Konzentration

Als nächstes wurde die in vitro Aktivität der Ribosomen im PolyU-abhängigen Proteinsynthese-System bestimmt. Die relativen Einbauraten von $[^{14}\text{C}]$ -Phenylalanin wurden dabei als Funktion der eingesetzten Cycloheximidkonzentration aufgetragen. Der jeweilige 100% Wert entspricht der Einbaurate in Abwesenheit des Antibiotikums. In Abbildung 9a sind die Hemmkurven für Ribosomen vom Wildtyp A364A und der Mutante cy32 dargestellt.

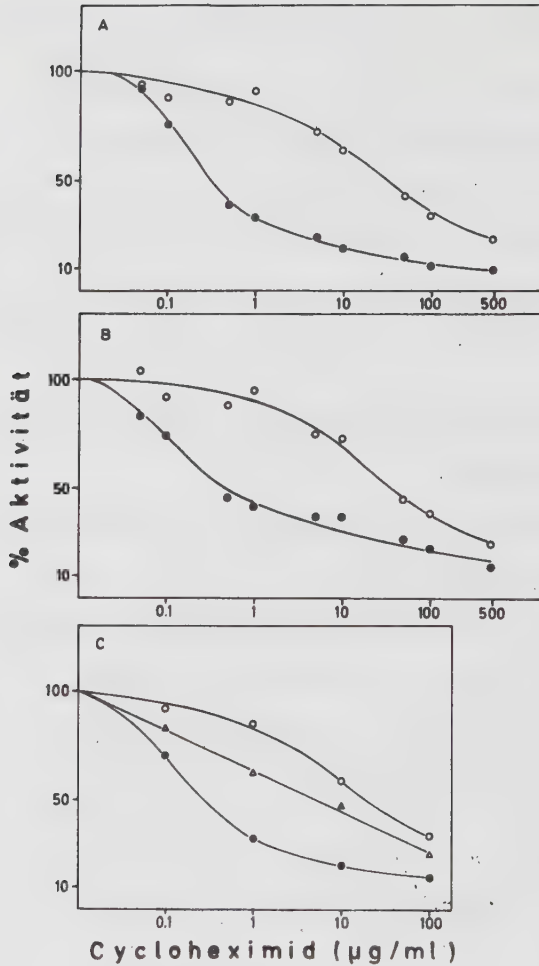


Abbildung 9:Einfluß steigender Cycloheximid-Konzentrationen auf die PolyU-abhängige Polyphenylalaninsynthese an nativen (A und C) und rekonstituierten (B) Ribosomen. ○: 80S aus cy32 (A), 40S aus A364A mit 60S aus cy32 (B), 80S aus cy32 x 3d(C); ●: 80S aus A364A (A), 40S aus cy32 mit 60S aus A364A (B), 80S aus A364A x Y166 (C); △: 80S aus A364A x cy32 (C). Die 40S- und 60S-Untereinheiten wurden im Verhältnis 1:1 gemischt.

Wie daraus hervorgeht, erfolgt 50% Hemmung der Aktivität von Wildtypribosomen bei einer Cycloheximid-Konzentration von 0,3 µg/ml, von Mutantenribosomen bei 30 µg/ml, also einer 100-fach höheren Konzentration. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den in vivo Daten.

b) Abhängigkeit der Aktivität homo- und heterolog rekonstituierter Ribosomen von der Cycloheximid-Konzentration

Durch Gelelektrophorese konnte bereits nachgewiesen werden, daß in der Mutante cy32 ein verändertes Protein der 60S-ribosomalen Untereinheit Resistenz gegenüber Cycloheximid verursacht. Um nun zu untersuchen, ob die Resistenz allein der 60S-Untereinheit der Mutante zuzuschreiben ist, wurden Untereinheiten von A364A und cy32 präpariert und heterolog rekonstituiert. Zur Kontrolle wurde die Aktivität homolog rekonstituierter Ribosomen gemessen. Sie entsprach der nativer Ribosomen. Es zeigte sich, daß sich Ribosomen aus Wildtyp-60S- und Mutanten-40S-Untereinheiten gegenüber steigenden Cycloheximid-Konzentrationen wie Wildtypribosomen, solche aus Wildtyp-40S- und Mutanten-60S-Untereinheiten wie Mutantenribosomen verhalten (Abb.9b). Die Resistenz ist also in der Mutante cy32 allein eine Eigenschaft der 60S-Untereinheit.

c) Abhängigkeit der Aktivität von Ribosomen aus diploiden Stämmen von der Cycloheximid-Konzentration

Aus den in IV.1.c und IV.3.a beschriebenen Daten ging hervor, daß in heterodiploiden Stämmen vom Genotyp cyh/cyh⁺ beide Formen des ribosomalen Proteins YL24 synthetisiert und in Ribosomen eingebaut werden. Um etwas über das mengenmäßige

Verhältnis zu erfahren, wurden nun Ribosomen aus homo- und heterodiploiden Stämmen im PolyU-System eingesetzt.

Wie zu erwarten war, verhielten sich Ribosomen aus homodiploiden wie die aus den entsprechenden haploiden Stämmen. Dagegen verläuft die Hemmkurve für Ribosomen aus den heterodiploiden Stämmen intermediär (Abb.9c). Geht man von der Annahme aus, daß beide Ribosomenarten im PolyU-System nebeneinander in Abwesenheit von Cycloheximid gleich aktiv sind, so ergibt sich für sie ein relativer Anteil von jeweils 50% (Tabelle 6).

Tabelle 6: Einfluß von Cycloheximid auf die in vitro Proteinsynthese durch Ribosomen aus verschiedenen diploiden Stämmen.

Cyclo- heximid (µg/ml)	relat. Aktivität im PolyU System (%) ¹⁾			Resistente Ribosomen in C (%) ²⁾
	A A364A x Y166	B cy32 x cy3D	C cy32 x Y166	
0,1	70,4	92,0	82,8	57,5
1	32,3	85,0	62,4	57,0
10	20,1	58,7	47,3	70,5
100	14,5	33,4	24,9	55,0

1) 100% (ohne Cycloheximid) entsprechen 24 500 bis 26 000 cpm oder 245 bis 260 pMol Phenylalanin eingebaut pro 50 µl Testansatz. Die Werte sind der Durchschnitt aus 2 Experimenten.

2) errechnet aus der Differenz (C - A) geteilt durch (B - A)

5. Kreuzresistenz von Mutantenribosomen gegenüber anderen Protein-synthese-Inhibitoren

Um zu untersuchen, ob das veränderte Protein YL24 auch Resistenz gegen andere Antibiotika verleiht, wurde die Einwirkung folgender Inhibitoren der Proteinbiosynthese in Eukaryonten auf Wildtyp- und Mutantenribosomen getestet: Anisomycin, Emetin, Hygromycin B, Trichodermin und Verrucarin A. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Wirkung verschiedener Antibiotika auf Wildtyp A364A und cy32 in vivo und in vitro. Die jeweils zuerst genannte Zahl bezieht sich auf den Wildtyp, die zweite auf die Mutante.

Antibiotikum	MHK [µg/ml]	K ₁₀ ¹⁾	K ₅₀ ²⁾	Restaktivität ³⁾ %
Anisomycin	50/50	0,05/0,05	0,5/0,5	8/8
Emetin	>1000/>1000	0,75/7,5	13/20	25/25
Hygromycin B	50/50	1,5/1,5	>100/15	60/30
Trichodermin	20/5	0,2/2,0	100/>100	50/70
Verrucarin A	75/50	0,07/0,03	1,0/0,5	25/25
Cycloheximid	0,25/150	0,02/0,5	0,3/30	15/30

1) Diejenige Antibiotikums-Konzentration, die im PolyU-System zu 10% Hemmung der Proteinsyntheseaktivität führt

2) entsprechend 1) für 50% Hemmung

3) in Gegenwart von 100 µg/ml Antibiotikum im PolyU-System

Sie zeigen, daß die cyh-x32 Mutation die Sensitivität der Ribosomen auch gegenüber Emetin, Hygromycin B, Trichodermin und Verrucarin A beeinflußt, wenn auch auf unterschiedliche

Weise. Dem zum Teil flacheren bzw. steileren Verlauf der Hemmkurven wurde dadurch Rechnung getragen, daß neben den Antibiotika-Konzentrationen, die zu 50% Hemmung der Ribosomenaktivität in vitro führen (K_{50}), auch die 10% Hemmung verursachenden Konzentrationen (K_{10}) angegeben wurden.

V. Untersuchung der Bindung von Cycloheximid an Ribosomen aus Wildtyp und Cycloheximid-resistenten Mutanten mittels Gleichgewichtsdialyse

1. Bindung von Cycloheximid an 80S Ribosomen

Mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse sollte geklärt werden, wieviele Bindungsstellen für Cycloheximid auf dem Heferibosom existieren und ob und wie weit die Bindungsaffinität der Mutantenribosomen für das Antibiotikum verändert ist.

Dazu wurden Ribosomen gegen 11 verschiedene Konzentrationen an [^3H]-Cycloheximid dialysiert. Nach Umrechnung der cpm-Werte für freies und gebundenes Antibiotikum wurden die Messpunkte in Form von "Scatchard-Plots" aufgetragen; Abb.10a zeigt sie für Wildtyp- und cy32-Ribosomen.

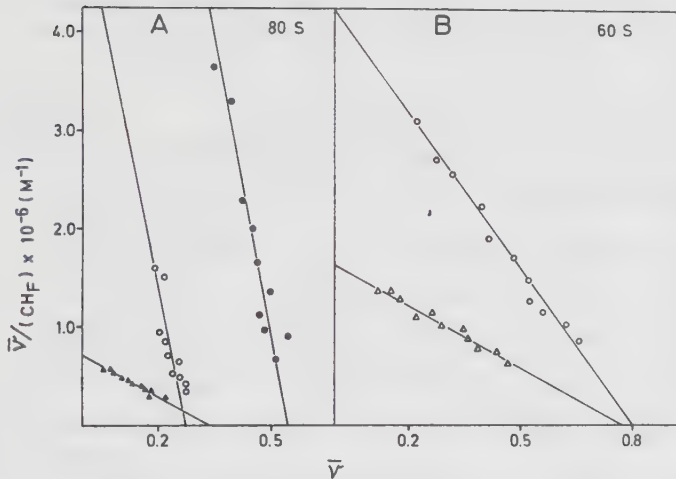


Abbildung 10: Scatchard Plots für Cycloheximid-Bindung an Ribosomen (A) und 60S Untereinheiten (B) aus A364A und cy32.

A: Hochsalzribosomen aus A364A ohne (O) bzw. mit S100 Extrakt (●);
Niedrigsalzribosomen aus cy32 mit S100 Extrakt aus A364A (Δ).

B: 60S Untereinheiten aus A364A (O) und cy32 (Δ).

Die Assoziationskonstante K_A entspricht dabei der Steigung der Geraden. Die Bindungsdaten für Ribosomen aus verschiedenen Wildtyp- und Mutantenstämmen sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: Assoziationskonstanten (K_A) für die Bindung von $[^3\text{H}]$ -Cycloheximid an Ribosomen bzw. 60S-Untereinheiten von Wildtyp und resistenten Mutanten. Die Zahlen stellen den Durchschnitt der in mindestens 2 unabhängigen Experimenten ermittelten Werte dar. Die Bedingungen für die Gleichgewichtsdialyse sind unter Material und Methoden, die Bestimmung der K_A -Werte im Text beschrieben. n.b.: nicht bestimmt.

Stamm	K_A (80S) $[\text{M}^{-1}]$	K_A (60S) $[\text{M}^{-1}]$		MHK $[\text{mg/l}]$
		-S100	+S100	
A364A } A-1 } ts 437 }	$2,0 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^7$	0,5
cy32	$2,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	150
sp1	$4,1 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	n.b.	5
SR17 } 200-1 }	$4,5 \times 10^6$	n.b.	n.b.	50 200

Aus den 80S-Bindungsdaten lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- Das Bindungsverhältnis (Abszisse) überschreitet nie den Wert 1. Es läßt sich auch gegen die Cycloheximid-Konzentration in Form einer Sättigungskurve mit einem einzigen Plateau auftragen. Dies spricht für die Existenz einer einzigen spezifischen Bindungsstelle.
- Die Resistenz aller untersuchten Mutanten läßt sich in einer verminderten Affinität der Ribosomen für Cycloheximid ausdrücken.
- Wie aus dem Vergleich der K_A - und MHK-Werte hervorgeht, besteht kein quantitativer Zusammenhang zwischen dem Grad der in vivo Resistenz und der Bindungsaffinität der Ribosomen für Cycloheximid.

- Die Mutation, die eine Erhöhung der in vivo Resistenz des Derivats 200-1 bewirkt, verändert nicht die ribosomale Bindung von Cycloheximid. In diesem Zusammenhang muß auch auf die Identität des ribosomalen Proteinmusters von SR17 und 200-1 in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nochmals hingewiesen werden.

2. Bindung von Cycloheximid an ribosomale Untereinheiten

Zur Lokalisation der Cycloheximid-Bindungsstelle wurde Gleichgewichtsdialyse mit ribosomalen Untereinheiten durchgeführt. Während keine Bindung an 40S-Untereinheiten erfolgte, wurde spezifische Bindung von Cycloheximid an 60S-Untereinheiten gemessen. Wie in Abb.10b gezeigt, liegt die Zahl der gemessenen Bindungsstellen höher (0,7 bis 0,8) als für 80S-Ribosomen, jedoch ebenfalls unter 1. Der K_A -Wert für 60S-Untereinheiten des Wildtyps ($5,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) liegt jedoch niedriger als der für 80S-Ribosomen ($2,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), während 60S-Untereinheiten und 80S-Ribosomen der Mutante cy32 gleiche Affinität für das Antibiotikum besitzen ($2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)(Tabelle 8).

Um diesen Befund und die Beobachtung, daß das molare Bindungsverhältnis je nach Ribosomen-Präparationsbedingungen variiert, zu erklären, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

3. Einfluß von Überstandsfaktoren auf die Cycloheximid-Bindung durch 80S-Ribosomen

Werden hochsalzgereinigte Ribosomen in die Gleichgewichtsdialyse zur Bestimmung der K_A -Werte eingesetzt, nimmt die Zahl

der gemessenen Bindungsstellen deutlich ab (Abb.10a).

Da aber auch für Niedrigsalzribosomen nur Werte zwischen 0,2 und 0,5 gemessen werden konnten, bestand Grund zur Annahme, daß ein relativ schwach ans Ribosom gebundener Faktor für die Cycloheximidbindung benötigt wird, und daß dieser Faktor während der Ribosomen-Präparation teilweise abgewaschen wird. Folglich wurden K_A -Werte von Hochsalz- und Niedrigsalz-Ribosomen in An- bzw. Abwesenheit von S100 Fraktion und Hochsalzüberstand bestimmt.

Die erhaltenen Werte für den Wildtyp A364A und cy32 sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Sie lassen sich folgendermaßen interpretieren:

- Hochsalzribosomen, in geringerem Maße auch Niedrigsalzribosomen von beiden Stämmen binden nach Zugabe von S100-Fraktion oder Hochsalzüberstand aus Wildtypzellen mehr Cycloheximid als in Abwesenheit von Überstand. Die Überstandsfraktionen enthalten also einen oder mehrere Faktoren, die für die Cycloheximid-Bindung ans Ribosom nötig sind.
- Überstandsfraktionen aus cy32 zeigen denselben Effekt wie die aus A364A sowohl auf Wildtyp- als auch auf Mutantenribosomen. Da in allen Fällen die Affinität der jeweiligen Ribosomen für Cycloheximid unverändert bleibt (nicht gezeigt), kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß der geforderte Faktor mit dem ribosomalen Protein YL24 identisch ist. In diesem Falle nämlich müßte die Bindungsaffinität von Wildtypribosomen durch Zugabe von Mutantenüberstand erniedrigt, die von Mutantenribosomen durch Zugabe von Wildtypüberstand erhöht werden.

Tabelle 9: Einfluß der Präparationsbedingungen und der Zugabe von Überstandsfraktionen auf die Bindungseffizienz von 80S-Ribosomen für Cycloheximid.

Experiment	Ribosomen (Stamm)	Überstand (Stamm)	gebundenes ³⁾ Cycloheximid pro Ribosom
I	ns ¹⁾ (A364A)	-	0,200
	ns (A364A)	S100 (A364A)	0,320
	ns (A364A)	H.Ü. ²⁾ (A364A)	0,320
	hs (A364A)	-	0,060
	hs (A364A)	S100 (A364A)	0,290
	hs (A364A)	H.Ü. (A364A)	0,340
II	hs (A364A)	-	0,100
	hs (A364A)	S100 (cy32)	0,290
	hs (A364A)	H.Ü. (cy32)	0,160
III	ns (cy32)	-	0,160
	ns (cy32)	S100 (A364A)	0,340
	hs (cy32)	-	0,038
	hs (cy32)	S100 (A364A)	0,068
	hs (cy32)	H.Ü. (A364A)	0,051
	hs (cy32)	S100 (cy32)	0,072
	hs (cy32)	H.Ü. (cy32)	0,046

1) ns, Niedrigsalz-Präparation; hs, Hochsalz-Präparation

2) H.Ü., Hochsalzüberstand

3) Das molare Verhältnis Antibiotikum/Ribosom im Testansatz betrug 0,58 für Wildtyp- und 1,20 für cy32-Ribosomen.

4. Einfluß von Überstandsfaktoren auf die Cycloheximid-Bindung durch 60S-Untereinheiten

Da 60S-Untereinheiten in Gegenwart von 0,5 M KCl präpariert wurden, also unter Hochsalzbedingungen, kann angenommen werden, daß sie nur zu einem geringen Anteil, wenn überhaupt, gebundenen Faktor enthalten. Trotzdem liegt das für sie gemessene Cycloheximid-Bindungsverhältnis hoch (0,7 - 0,8). Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß Zugabe von Überstandsfractionen darauf keinen Einfluß ausübt; dagegen nahm die Bindungsaffinität von 60S-Untereinheiten des Wildtyps in Abhängigkeit von der Menge an zugegebenem S100-Extrakt bzw. Hochsalzüberstand zu, und zwar bis zu Werten, die die für 80S-Ribosomen übertreffen (bis $3,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) (Abb.11).

Das Vorliegen einer stöchiometrischen Abhängigkeit spricht gegen die Möglichkeit einer enzymatischen Wirkung des Überstandsfaktors auf die ribosomale Cycloheximidbindung.

Um zu prüfen, ob die beobachteten Effekte auf der Anwesenheit von nicht vollständig abzentrifugierten 40S-Untereinheiten im Überstand beruhen, wurden die Proteine des S100-Extrakts und des Hochsalzüberstands durch zweidimensionale Gelelektrophorese (System A) aufgetrennt, doch waren selbst in überladenen Gelen keine ribosomalen Proteine nachweisbar. 60S-Untereinheiten von cy32 blieben im Gegensatz zu denen von A364A durch die Zugabe von Überstandsfractionen unbeeinflusst.

Versuche, den Faktor bzw. die Faktoren über DEAE-Cellulose- und Hydroxyapatit-Säulen zu reinigen, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht zu Ende geführt werden.

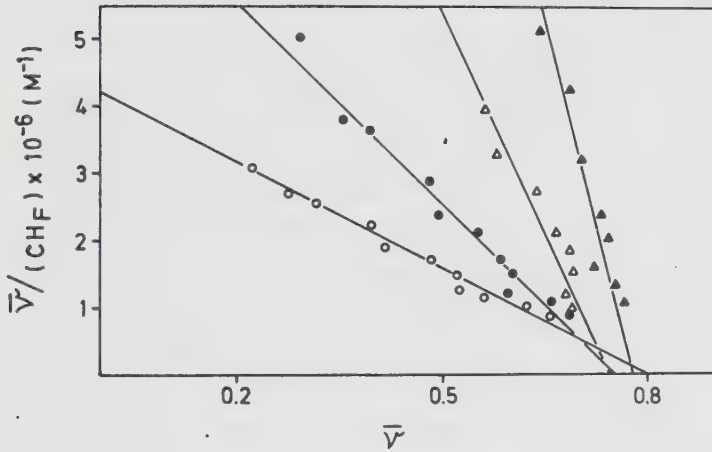


Abbildung 11: Einfluß von Überstandsfraktionen auf die Cycloheximid-Bindung an 60S-Untereinheiten des Wildtyps.

O: ohne Überstand; ●: mit Hochsalzüberstand (0,12 mg Protein/ml);
Δ: mit Hochsalzüberstand (0,6 mg Protein/ml);
▲: mit S100 Extrakt (8 mg Protein/ml).

5. Einfluß anderer Proteinsyntheseinhibitoren auf die
Cycloheximid-Bindung durch 80S-Ribosomen des Wildstamms A364A

Mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse sollte weiter untersucht werden, ob die Kreuzresistenz der Ribosomen von cy32 gegenüber anderen Antibiotika auf eine Überlappung der ribosomalen Bindungsstellen zurückzuführen ist. Dazu wurden die Protein-synthese-Inhibitoren Anisomycin, Emetin, Hygromycin B, Trichodermin und Verrucarin A in jeweils 5-fachem Überschuß über Cycloheximid für die Gleichgewichtsdialyse eingesetzt. Tabelle 10 zeigt, daß unter diesen Bedingungen keines dieser Antibiotika mit Cycloheximid um die Bindungsstelle konkurriert. Zum Vergleich wurde unmarkiertes Cycloheximid, ebenfalls im 5-fachen Überschuß über die [^3H]-markierte Substanz, eingesetzt. Die an die Ribosomen gebundene Radioaktivität konnte so bis auf 26% ausverdünnt werden.

Tabelle 10: Einfluß anderer Antibiotika auf die Cycloheximid-
Bindung an 80S-Ribosomen vom Wildtyp A364A.

Antibiotikum	cpm gebunden	%
-	2 448	100
Anisomycin	2 509	102
Emetin	2 494	102
Hygromycin B	2 451	100
Trichodermin	2 498	102
Verrucarin A	2 435	99
Cycloheximid (unmarkiert)	640	26

VI. Reinigung des ribosomalen Proteins YL24 der Stämme A364A, cy32 und sp1

Im bisherigen Verlauf der Arbeit wurden Auswirkungen der Veränderung des Proteins YL24 in den Mutanten beschrieben. Um nun festzustellen, welcher Art diese zu Cycloheximid-Resistenz führende Veränderung ist, mußte zunächst das Protein vom Wildtyp und von Mutanten isoliert werden.

1. Präparation von 60S-ribosomalem Protein

Zellen wurden in einem Fermenter bis zu einem Titer von 4×10^7 pro ml angezogen. Aus einem 50 l Ansatz konnten so 200 g Zellen (Naßgewicht) geerntet werden. Der Aufbruch erfolgte in Portionen zu 10 g im Braun-Homogenisator. Die hochsalzgereinigten Ribosomen (5 g/Ansatz) wurden dissoziiert und die Untereinheiten in 4 Zonalläufen getrennt. Aus den 60S-Untereinheiten (1,8 g/Ansatz) wurde durch Essigsäurefällung ribosomales Protein extrahiert (0,6 g/Ansatz).

2. Trennung der ribosomalen Proteine über Cl.C-Säule

Das Proteingemisch wurde in einem Volumen von 40 ml auf eine CMC52-Säule mit den Ausmaßen 2,5 x 42 cm aufgetragen, mit einem 6 l Gradienten von 50 bis 650 mM NaAcetat bei einer Fließgeschwindigkeit von 45 ml/Stunde eluiert und nach Durchfluß durch ein Photometer (278 nm) in 15 ml Fraktionen aufgefangen. Abb. 12A zeigt einen Ausschnitt aus dem Elutionsprofil von Wildtyp-Protein.

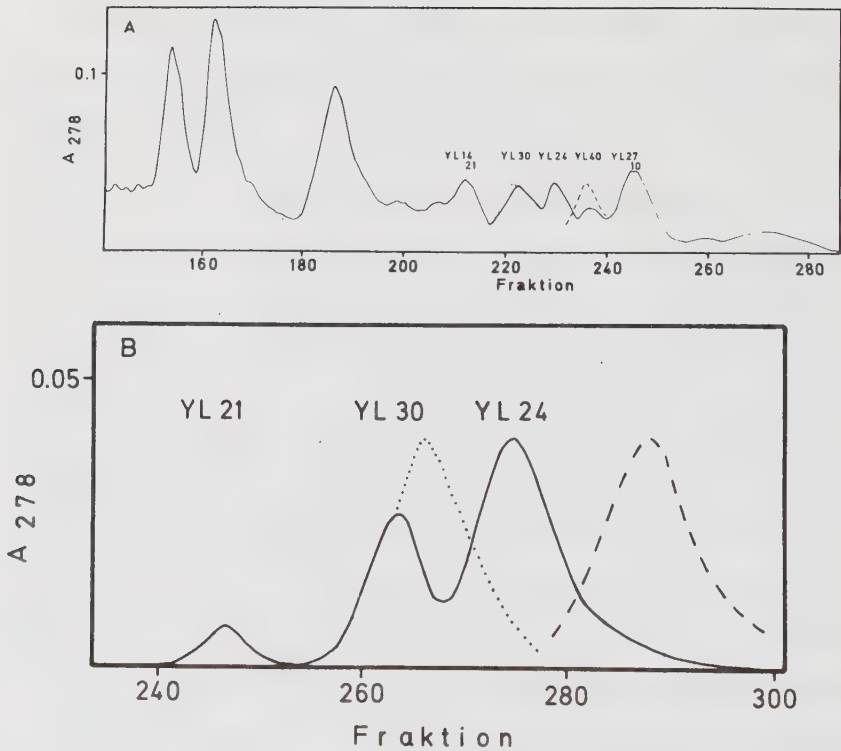


Abbildung 12: Ausschnitte aus den Elutionsprofilen ribosomaler Proteine aus Wildtyp A364A. Die relative Position des Proteins YL24 aus cy32 ist mit unterbrochener Linie, aus sp1 gepunktet eingezeichnet.

A: CM52-Säule, Ausschnitt 2220-4650 ml Elutionsvolumen (270-520 mM Na-Acetat).

B: P11-Säule, Ausschnitt 1000-1360 ml Elutionsvolumen (510-650 mM NaCl).

Die Positionen der Mutanten-YL24-Proteine sind ebenfalls eingezeichnet. Sie wurden entsprechend ihrer Ladungsveränderung früher bzw. später eluiert. Keines der 3 verschiedenen YL24 Formen war frei von Kontamination durch andere Proteine; als Beispiel dafür ist in Abb.13A die elektrophoretische Auftrennung der YL24 enthaltenden Fraktionen von cy32 gezeigt. Ein 2. Säulenreinigungsschritt war deshalb in allen Fällen notwendig.

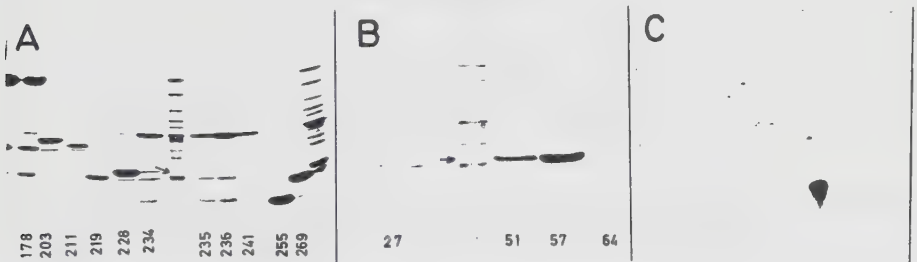


Abbildung 13: Auftrennung YL24 (Pfeil) enthaltender Fraktionen des CMC-Säuleneluats (A) und des Phosphocellulose-Säuleneluats (B,C) durch eindimensionale (A,B) bzw. zweidimensionale Gelelektrophorese nach System A (C).

Zur Identifizierung des gereinigten Proteins wurden in C 25 µg 80S-ribosomales Protein aus cy32 mit aufgetrennt, in A und B 25 µg 60S-ribosomales Protein aus cy32.

3. Trennung ribosomaler Proteine über Phosphocellulose-

P11-Säule

Die YL24 enthaltenden CMC-Säulenfraktionen wurden vereinigt und nach Dialyse gegen 1% Essigsäure und Lyophilisieren in 30 ml P11-Puffer aufgenommen. Die Proteine wurden aus einer P11-Säule mit den Ausmaßen 1 x 43 cm mit einem 1,5 l Gradienten aus 150 bis 700 mM NaCl bei einer Fließgeschwindigkeit von 15 ml/Stunde eluiert und in 5 ml Fraktionen gesammelt. Die Elutionsprofile sind in Abb.12B dargestellt. Auch hier macht sich die unterschiedliche Ladung der Mutantenproteine bemerkbar; die stärker saure Form wird früher, die mehr basische später eluiert als das Wildtyp-Protein. Die Positionen der Proteine in den Elutionsprofilen beider Säulen sind in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11: Position der Proteine YL24 aus A364A, cy32 und sp1 im Elutionsprofil. Die Chromatographie-Bedingungen sind im Text erläutert.

YL24 aus:	CM52-Säule		P11-Säule	
	Na-Acetat [mM]	Volumen [ml]	NaCl [mM]	Volumen [ml]
A364A	415	3660	600	1220
cy32	426	3780	625	1290
sp1	406	3570	580	1170

Nach gelelektrophoretischer Analyse wurden diejenigen YL24 enthaltenden Fraktionen vereinigt, die zu nicht mehr als 5% (Schätzwert) mit anderen Proteinen kontaminiert waren, ebenso diejenigen, die nur YL30 bzw. beide Proteine enthielten. Die Reinheit des Proteins YL24 ist aus Abb. 13 B und C am Beispiel des Proteins von cy32 zu entnehmen. Die Proteine wurden zur Entfernung des Harnstoffs extensiv unter mehrmaligem Wechsel gegen 1%ige Essigsäure dialysiert und in lyophilisierter Form bei -20°C gelagert. Die Ausbeuten an YL24 betrugen 3,2 mg Protein des Wildtyps, 6,4 mg der Mutante cy32 und 2,0 mg der Mutante sp1.

VII. Charakterisierung des ribosomalen Proteins YL24 aus Wildtyp A364A und den Mutanten cy32 und sp1

1. Immunologische Untersuchung

Da in Mutantenproteinen häufig die antigenen Eigenschaften verändert sind, wurde zunächst eine immunologische Methode zum qualitativen Nachweis von Veränderungen des Proteins YL24 aus den Mutanten cy32 und sp1 gewählt. Da gereinigtes Wildtypprotein nur begrenzt zur Verfügung stand, wurde zur Gewinnung des Antiserums Protein der Mutante cy32 verwendet. Falls durch die Mutation in diesem Protein eine neue antigene Determinante entstanden ist, müßte sich das bei der Immundoppeldiffusion in der Bildung eines Sporns am Übergang der Präzipitationslinien des Wildtyp- und cy32-Proteins bemerkbar machen.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments. Die heterologen Antigene aus Wildtyp und sp1 wurden zu beiden Seiten des homologen Antigens, zusätzlich auch nebeneinander angeordnet. Wie aus dem Präzipitationsmuster zu ersehen ist, verhalten sich die drei Formen des Proteins YL24 immunologisch gleich.

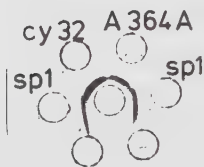


Abbildung 14: Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony. Je 10 μ l Anti-YL24-Rohserum (zentrales Loch) diffundierten 48 Stunden bei 4°C gegen je 10 μ l (10 μ g) gereinigtes YL24 Protein

2. Zweidimensionale Auftrennung tryptischer Peptide

Um die Art der Veränderung der Mutantenproteine YL24 zu bestimmen, wurden tryptische Peptide hergestellt, auf Cellulose-Dünnschichtfolien zweidimensional aufgetrennt und mit einer Indikatorlösung besprüht. Abb. 15 zeigt die Peptidmuster für den Wildtyp und die Mutante cy32, jeweils mit 3 verschiedenen Sprühreagenzien sichtbar gemacht, sowie das Fluorescamin-besprühte Peptidmuster für die Mutante sp1.

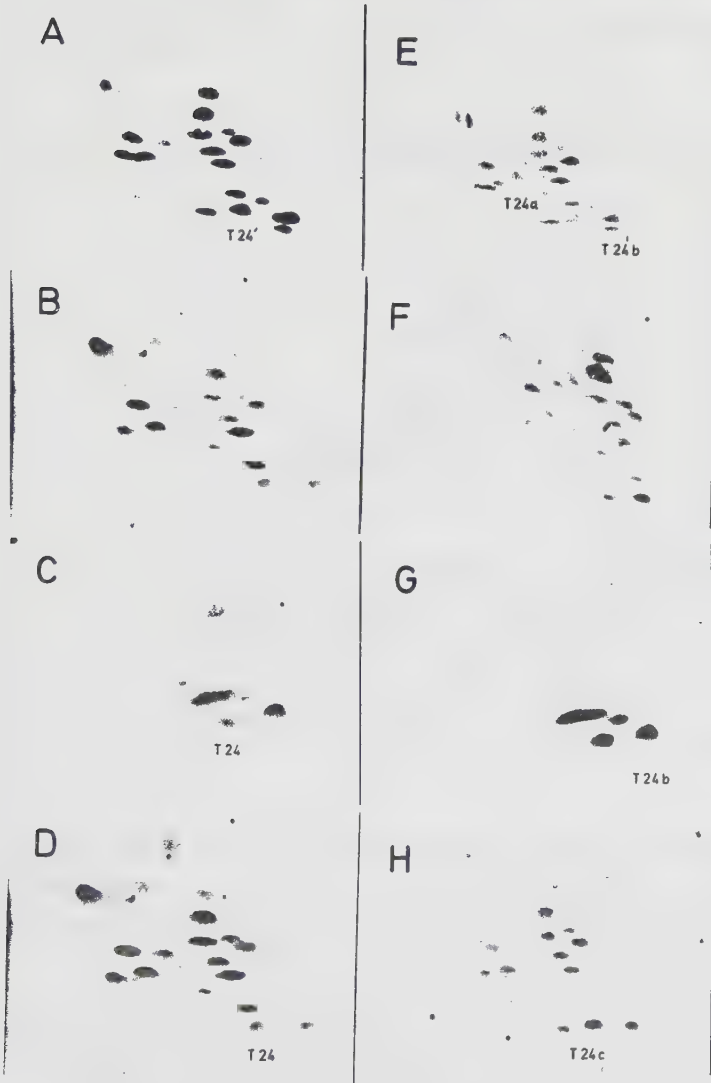


Abbildung 15: Tryptische Peptid-Muster für YL24 aus A364A (A-D), cy32 (E-G) und sp1 (H), sichtbar gemacht durch Besprühen mit Ninhydrin (A,E), Fluorescamin (B,D,F,H) bzw. Phenanthrenchinon (C,G).

Eine schematische Darstellung (Abb.16) soll die Identifizierung der nummerierten Peptide erleichtern.

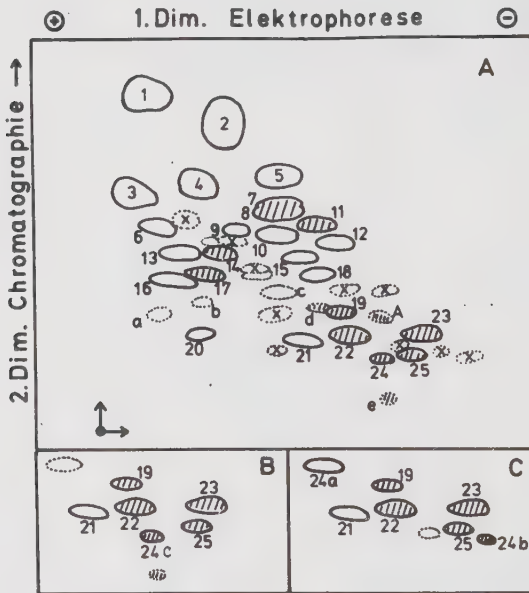


Abbildung 16: Schemazeichnung der zweidimensionalen Chromatogramme tryptischer Peptide des ribosomalen Proteins YL24. Zur Bezeichnung der tryptischen Peptide wird im Text ein "T" vor die Zahl gesetzt. A: Wildtyp, B: sp1 (Ausschnitt), C: cy32 (Ausschnitt). Weitere Erklärungen im Text.

Die mit "x" bezeichneten Flecken entsprechen Verunreinigungen durch Peptide des ribosomalen Proteins YL30. Dies wurde durch Vergleichen der tryptischen Peptide von YL24 und YL30 sowie eines Gemisches dieser Proteine bestimmt. Die mit Kleinbuch-

staben versehenen Flecken stellen schwach angefärbte Peptide dar. Für einige davon konnte durch Aminosäureanalyse gezeigt werden, daß sie unvollständig gespaltene Peptide darstellen. Mit Phenanthrenchinon sichtbar gemachte Arginin enthaltende Peptide wurden im Schema schraffiert gezeichnet. Die Position von Arginin ist mit "A" bezeichnet.

Aus der von Itoh et al (94) veröffentlichten Aminosäureanalyse wurde unter Zugrundelegung eines (ungefähren) Molekulargewichts von 16 500 (108) für YL24 eine Kettenlänge von 129 Aminosäuren mit einem Anteil von 16 Lysin- und 10 Arginin-Resten berechnet. Durch Spaltung des Proteins YL24 mit Trypsin müßten demnach 27 Spaltprodukte mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 5 Aminosäuren entstehen. Berücksichtigt man die Möglichkeit, daß sich einige Peptide nach der zweidimensionalen Auftrennung überschneiden oder nur als schwach gefärbte bzw. fluoreszierende Flecken in Erscheinung treten, stimmt das Ergebnis (25 Peptide, davon 9 Arginin enthaltende) gut mit den errechneten Daten überein. Zudem muß Arginin als weiteres Spaltprodukt hinzugerechnet werden.

Für beide Mutanten ließen sich Unterschiede im Peptidmuster feststellen:

cy 32: Anstelle des Peptids 24 (bis auf einen schwachen Rest) treten die Peptide T24a und T24b. Das Peptid T24a fiel durch einen deutlich roten Farbton nach Besprühen mit Ninhydrin auf. Eine vorläufige Erklärung für die Veränderung im YL24 Protein von cy32 ist nach den bisherigen Daten der Austausch einer neutralen oder sauren Aminosäure gegen Lysin. Demnach wäre T24a das Lysin-enthaltende, T24b das Arginin-enthaltende Spaltprodukt von Peptid T24, wie aus der Phenanthrenchinon-Färbung hervorgeht

sp1: Auch hier liegt die Veränderung im Peptid T24. Es wandert in beiden Dimensionen langsamer, erscheint also nach links und etwas nach unten verschoben (T24c). Die gleichzeitige Verschiebung des Peptids e deutet darauf hin, daß "e" ein unvollständig gespaltenes, T24 bzw. T24c enthaltendes tryptisches Peptid darstellt. Bisher läßt sich also die Mutation in Mutante sp1 als Austausch einer neutralen gegen eine saure Aminosäure erklären.

3. Aminosäureanalysen

a) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Wildtyp- und Mutantenprotein YL24

Zur Bestimmung der Aminosäure-Austausche wurde zunächst eine Aminosäureanalyse der ungespaltenen YL24 Proteine des Wildtyps und der Mutanten cy32 und sp1 durchgeführt. Dazu wurden jeweils 100 µg Protein unter gleichen Bedingungen hydrolysiert und 1/10 davon eingesetzt. Die Mol-% Werte der einzelnen Aminosäuren wurden von einem an den Analysator angeschlossenen Integrator berechnet und ausgedruckt.

Die in Tabelle 12a eingetragenen Werte entsprechen dem Durchschnitt aus 3 Analysen für die Proteine vom Wildtyp und der Mutante cy32, bzw. 2 Analysen für das Protein der Mutante sp1. Die Daten für das Wildtypprotein stimmen im wesentlichen mit der in (94) veröffentlichten Analyse überein.

Das Protein der Mutante cy32 unterscheidet sich von dem des Wildtyps vor allem im Gehalt an Glutaminsäure, Lysin und Arginin. Ein Austausch Glutaminsäure oder Glutamin gegen Lysin wäre im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen.

Tabelle 12: a) Aminosäurezusammensetzung des ribosomalen Proteins YL24 vom Wildtyp A364A und den Mutanten cy32 und sp1, angegeben in Mol-%. Die Proteine wurden in konstant siedender HCl 20 Stunden bei 110°C hydrolysiert. b) Einfluß der Hydrolysezeiten auf die Aminosäureausbeuten bei der Analyse des Proteins YL24 vom Wildtyp.

Die Hydrolysetemperatur betrug 110°C.

Aminosäure	a					b		
	A364A	sp1	Diff.	cy32	Diff.	12 Std.	18 Std.	24 Std.
Asx	5.7	6.1	+0.4	5.5	-0.2	6,1	5,8	5,0
Thr	3.4	3.5	+0.1	3.3	-0.1	3,5	3,0	2,7
Ser	3.6	4.5	+0.9	3.3	-0.3	4,2	3,3	3,1
Glx	6.5	6.6	+0.1	5.7	-0.8	6,8	6,5	6,5
Pro	5.2	5.3	+0.1	5.7	+0.5	5,1	6,3	5,4
Gly	12.8	12.4	-0.4	12.2	-0.6	12,7	12,0	12,5
Ala	9.0	9.1	+0.1	8.3	-0.7	8,0	7,6	9,9
Val	5.6	6.3	+0.7	5.7	+0.1	5,5	5,7	6,9
Met	1.6	1.6	0	1.8	+0.2	1,3	1,2	2,0
Ile	5.2	5.0	-0.2	5.0	-0.2	4,3	4,8	5,2
Leu	6.3	5.9	-0.4	6.1	-0.2	5,5	5,1	5,3
Tyr	3.3	3.0	-0.3	3.3	0	3,2	3,0	3,0
Phe	3.4	3.2	-0.2	3.6	+0.2	3,6	3,6	3,4
His	7.1	6.5	-0.6	7.1	0	8,7	8,9	7,9
Lys	13.1	13.3	+0.2	14.5	+1.4	14,5	15,4	13,4
Arg	8.2	7.6	-0.6	8.9	+0.7	7,0	7,6	7,7
Summe	100,0	99.9		100.0		100,0	99,8	99,9

Das Protein der Mutante sp1 weist im Gehalt mehrerer Aminosäuren größere Unterschiede zum Wildtyp-Protein auf, die keine eindeutige Aussage zulassen.

Um den Einfluß der Hydrolysedauer auf die Ausbeuten der einzelnen Aminosäuren zu untersuchen, wurden Aliquots des Wildtypproteins 12, 18 und 24 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Die Aminosäureausbeuten sind in Tabelle 12b eingetragen. In die Werte geht einerseits die Kinetik der Spaltung, andererseits die Stabilität der Aminosäuren unter Hydrolysebedingungen mit ein. Die relative Länge einiger Aminosäuren wie Asparaginsäure, Threonin und Serin nimmt dabei mit fortschreitender Hydrolysedauer ab, die von Valin, Isoleucin und Arginin zu. Für die anderen Aminosäuren ist keine eindeutige Tendenz nachzuweisen.

b) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide T24, T24a, T24b und T24c

Eine eindeutige Bestimmung der Aminosäureaustausche in den Mutantenproteinen ermöglichte erst eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung des tryptischen Peptids T24 und seiner Mutanten-Derivate. Dazu wurde zunächst in einer Vor-Analyse die Konzentration der Aminosäuren im jeweiligen Hydrolysat annähernd bestimmt. Daraufhin wurde diejenige Menge Hydrolysat aufgetragen, die 5 bis 10 nMol extrahiertem Peptid entsprach. Das Ergebnis der Analysen zeigt Tabelle 13. Demnach besitzt das Peptid T24 die Brutto-Zusammensetzung Ala₁Arg₁Glx₁Gly₂₋₃His₂₋₃Met₁.

Tabelle 13: Aminosäurezusammensetzung des tryptischen Peptids T24 und der entsprechenden Mutantenpeptide. Die Alanin- bzw. Argininmenge wurde dabei gleich 1,0 gesetzt (unterstrichen).

Amino- säure	T24 (WT)	T24c (sp1)	T24a (cy32)	T24b (cy32)
Glx	1,0	1,0	-	-
Gly	2,4	2,6	2,5	-
Ala	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>	-
Met	0,9	0,5	1,1	-
His	2,6	2,6	-	2,5
Lys	-	-	0,8	-
Arg	0,8	1,0	-	<u>1,0</u>
Summe	8,7	8,7	5,4	3,5

Im Protein der Mutante cy32 kam es durch den Austausch von Glutaminsäure bzw. Glutamin gegen Lysin zur Bildung einer weiteren Trypsin-Spaltungsstelle. Statt des Peptids T24 treten nun 2 Spaltprodukte auf, mit der Brutto-Zusammensetzung $\text{Ala}_1\text{Gly}_{2-3}\text{Lys}_1\text{Met}_1$ und $\text{Arg}_1\text{His}_{2-}$. Der genetische Code läßt dabei sowohl einen Austausch Glutaminsäure (Codon GA_G^A) als auch Glutamin (CA_G^A) gegen Lysin (AA_G^A) zu.

Da Trypsin hinter Arginin und Lysin spaltet, kann die vorläufige Teilsequenz des Peptids T24 so geschrieben werden:

$(\text{Ala}_1\text{Gly}_{2-3}\text{Met}_1)\text{Glx-His}_{2-3}\text{-Arg.}$

Das Peptid T24c der Mutante sp1 weist dieselbe Aminosäurezusammensetzung wie das Wildtyppeptid T24 auf, obwohl es sich chromatographisch und elektrophoretisch deutlich davon unterscheidet. Da ja das Protein YL24 der Mutante sp1 stärker sauer ist als das Wildtyp-Protein, liegt die einzig mögliche Erklärung dafür in einem Austausch Glutamin gegen Glutaminsäure.

4. Auftrennung der durch Spaltung des Proteins YL24 vom Wildtyp und der Mutante sp1 mit Staphylococcen-Protease erhaltenen Peptide

Zur Untersuchung der Möglichkeit, daß ein Austausch Glutamin gegen Glutaminsäure den mehr sauren Charakter des Mutantenproteins bedingt, wurden Wildtyp- und Mutantenprotein YL24 durch Behandlung mit V8-Protease aus *Staphylococcus aureus* bei pH 4,0 gespalten. Unter dieser Bedingung spaltet das Enzym spezifisch nach Glutaminsäure. Der geforderte Austausch müßte demnach das Verschwinden eines Peptids und das Auftreten zweier neuer, kleinerer Spaltprodukte zur Folge haben.

Abbildung 17 zeigt die Auftrennung der Peptide durch eindimensionale SDS-Gelelektrophorese. Zur besseren Trennung wurde die Endkonzentration des Polyacrylamid-Gradienten gegenüber der für die Elektrophorese ribosomaler Proteine verwendeten auf 30% erhöht. Tatsächlich konnten Unterschiede festgestellt werden, die im Einklang mit dem für den Fall eines Austausches Glutamin gegen Glutaminsäure erwarteten Ergebnis stehen. Das Peptid 1 des Proteins YL24 vom Wildtyp wird im Fall der Mutante sp1 offensichtlich durch die kleineren Spaltprodukte 1a und 1b ersetzt. Die Peptide 1b und 4 waren vor allem in unvollständig entfärbten Gelen als getrennte Banden unterscheidbar. Das nicht vollständige Verschwinden der Peptidbande 1 deutet auf eine unvollständige Spaltung hin.

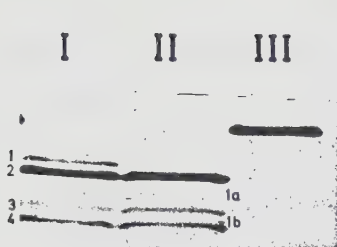


Abbildung 17: Auftrennung der mit Staphylococcen-Protease gespaltenen Proteine YL24 aus A364A (I) und sp1 (II) durch eindimensionale SDS-Gelelektrophorese. Der Polyacrylamid-Gradient betrug 10-30%. III: ungespaltenes Protein YL24 aus A364A. Die Numerierung der Peptide ist im Text erläutert.

Aus der Zahl der nachgewiesenen Peptide läßt sich die Mindestzahl der Glutaminsäure-Reste mit 3 für das Wildtypprotein bzw. 4 für das Mutantenprotein angeben. Durch das Auftreten sehr kleiner Peptide, die im Gel nicht mehr anfärbbar sind und durch eine mögliche Überlappung von Peptiden können sich diese Zahlen jedoch erhöhen.

Die Auftrennung der Peptide auf Dünnschichtplatten, wie für tryptische Peptide beschrieben, war offensichtlich aufgrund der Größe der wenigen Spaltprodukte unbefriedigend.

5. Bestimmung der Aminosäuresequenz der tryptischen Peptide T24 und T24c

Als letzter Schritt zur Charakterisierung der Cycloheximid-Resistenz der Mutanten cy32 und sp1 wurde die Sequenzierung der Peptide T24 des Wildtyp-Proteins YL24 und T24c des Proteins vom Stamm sp1 durchgeführt.

Der Identifizierung der Aminosäuren nach zweidimensionaler Auftrennung auf Dünnschichtfolien wurde das von Chang et al (100) veröffentlichte Schema zugrundegelegt.

Die DABTH-Aminosäuren erschienen nach Behandlung der Folien mit HCl-Dampf als rot-gefärbte Flecken, während der von DABTC-Diäthylamin gebildete Referenzfleck eine blaue Farbe aufwies. Ein ebenfalls blau gefärbtes Reaktionsprodukt aus PITC und DABITC diente als zusätzlicher Vergleichspunkt.

Für das Wildtyp-Peptid T24 wurde folgende Sequenz ermittelt:

Gly-Met-Ala-Gly-Gly-Gln-His-His-His-Arg.

Das Peptid T24c der Mutante sp1 hatte die Sequenz:

Gly-Met-Ala-Gly-Gly-Glu-His-His-His-Arg.

Damit ist der geforderte Aminosäureaustausch Glutamin gegen Glutaminsäure für das Protein YL24 der Mutante sp1 bestätigt. Zur Kontrolle wurden die DABTH-Derivate der authentischen Aminosäuren Glutamin, Glutaminsäure und Histidin präpariert und aufgetrennt.

Abbildung 18 gibt einen Überblick über die ermittelten Sequenzen und die Art der Aminosäure- bzw. Basenaustausche, die zur Cycloheximid-Resistenz in den Mutanten führten. Die Sequenz der Peptide T24a und T24b der Mutante cy32 konnte aus ihrer Aminosäurezusammensetzung in Verbindung mit der Sequenz des Peptids T24 bzw. T24c ermittelt werden.

Ein Vergleich mit der von Itoh et al (109) beschriebenen Sequenz der 5 N-terminalen Aminosäuren des Proteins YP41 (entspricht YL24 nach der hier verwendeten Nomenklatur) zeigt, daß das Peptid T24 nicht mit dem N-terminalen tryptischen Peptid identisch ist.

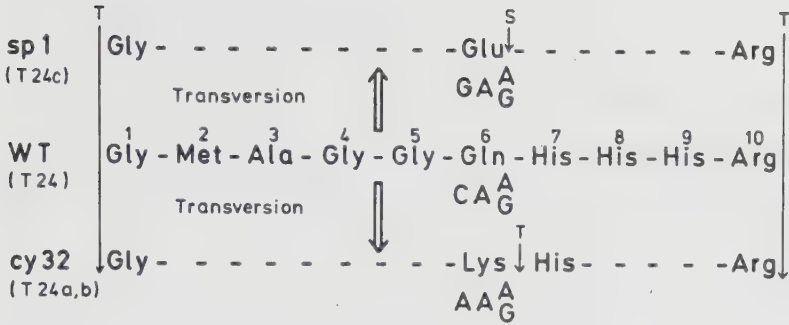


Abbildung 18: Vergleich der Aminosäuresequenz des tryptischen Peptids T24 des Proteins YL24 vom Wildtyp (WT) A364A und der entsprechenden Peptide der Mutantenproteine aus sp1 und cy32. Die Spaltstellen für Trypsin (T) und Staphylococcen-Protease V8 (S) sowie die Codons für die jeweilige Aminosäure 6 sind angegeben.

D. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel begonnen, Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit mutierten Komponenten des Proteinbiosynthese-Apparats zu isolieren und durch ihre Charakterisierung Informationen über Funktion und Biosynthese des 80S-Ribosoms zu gewinnen. Dazu wurden verschiedene Wege gewählt, nämlich die Isolierung folgender Mutantentypen:

1. temperaturkonditionale Mutanten,
2. Mutanten, die einen bereits bestehenden konditionalen Proteinsynthesedefekt supprimieren und
3. Antibiotika-resistente Mutanten.

Temperaturkonditionale Mutanten

250 temperatur- und 150 kältesensitive Mutanten wurden isoliert und im Doppelmarkierungsversuch auf ihre Fähigkeit zur Protein- und RNS-Synthese bei restriktiver Temperatur untersucht. Dabei konnten 9 von ihnen als Proteinsynthese-Mutanten identifiziert werden. Die gleichzeitige Hemmung der RNS-Synthese in diesen Stämmen läßt sich auf die koordinierte Kontrolle der Synthese ribosomaler Komponenten zurückführen (9,10).

Um die Möglichkeit eines Defekts der ribosomalen Assembly in kältesensitiven Mutanten (13,14) zu prüfen, wurden die Sedimentationsprofile für Ribosomen aus einigen kältesensitiven Proteinsynthesemutanten untersucht; es konnten jedoch keine Hinweise dafür gefunden werden.

Auch die Auftrennung ribosomaler Proteine aus 52 temperatur-konditionalen Mutanten lieferte keine Anzeichen für die Existenz einer ribosomalen Mutation.

Dagegen ermöglichte die Untersuchung der Zell-Extrakte von 21 temperatursensitiven Mutanten im Aminoacylierungstest den Nachweis veränderter Aminoacyl-tRNS-Synthetasen, und zwar für Prolin im Stamm ts13 und Valin im Stamm ts181.

Die intermediäre Aktivität des Enzyms in heterodiploiden Stämmen und die partielle Aktivität in der Revertante 181-16 zeigt, daß ts181 eine Mutation im Strukturgen der Valyl-tRNS-Synthetase besitzt.

Da die Valyl-tRNS-Synthetase von *Saccharomyces* aus 1 Polypeptid besteht (110), kann eine veränderte Wechselwirkung zwischen Untereinheiten als Ursache für die Temperatursensitivität ausgeschlossen werden.

Möglich ist jedoch, daß die Affinität des mutierten Enzyms für eines der Substrate Valin, ATP oder tRNS beeinträchtigt ist.

Suppressormutanten

Da Proteinsynthese-Defekte aufgrund veränderter Aminoacyl-tRNS-Synthetasen durch Mutationen in ribosomalen Proteinen kompensiert werden können (105), wurden 300 Revertanten temperatursensitiver Aminoacyl-tRNS-Synthetase-Mutanten isoliert. Der biochemische Nachweis eines veränderten ribosomalen Proteins konnte jedoch für keine der 10 untersuchten Revertanten erbracht werden. Eine weitere Untersuchung der Revertanten auf mutierte Komponenten der Proteinbiosynthese wurde zugunsten der Charakterisierung Antibiotika-resistenter Mutanten zurückgestellt.

Antibiotikaresistenz-Mutanten

Zur Selektion Antibiotika-resistenter Mutanten wurden Proteinsynthese-Inhibitoren verwendet, für die ein Effekt auf verschiedene Funktionen der 80S-Ribosomen nachgewiesen ist. Gelelektrophoretische Untersuchungen führten zur Identifizierung veränderter ribosomaler Proteine in 4 Cycloheximid-resistenten Mutanten.

Ursache der Cycloheximid-Resistenz in den Mutanten cy32, sp1, SR17 und 200-1

In den Mutanten cy32, sp1, SR17 und 200-1 konnte Cycloheximid-Resistenz auf eine Veränderung eines einzigen ribosomalen Proteins, nämlich YL24 zurückgeführt werden. Der genetische Nachweis dafür wurde durch Tetradenanalyse erbracht, die zeigte, daß in Sporen von heterodiploiden Stämmen das Mutantenprotein immer in Verbindung mit dem Resistenz-Phänotyp auftrat. Ein Grund dafür, daß es bisher nicht gelungen ist, in Cycloheximid-resistenten Mutanten von *S. cerevisiae* eine entsprechende Veränderung zu finden, ist in der Wahl der Methode für die zweidimensionale Trennung 80S-ribosomaler Proteine zu suchen: Die bis vor wenigen Jahren für diesen Zweck ausschließlich verwendete Methode war die von Kaltschmidt und Wittmann (86). In diesem System können leichte Veränderungen des Proteins YL24 wegen Überlagerung mit einem Protein der 40S-Untereinheit nicht entdeckt werden. Erst die Entwicklung neuer Elektrophorese-Methoden (85,87) ermöglichte die Identifizierung von Mutantenformen des Proteins YL24.

Es konnten zwei Formen unterschieden werden, eine mehr saure in einer, und eine mehr basische Form in drei anderen Mutanten. Dazu kommen nach neueren Untersuchungen noch zwei weitere Mutanten, die ebenfalls eine mehr basische Proteinform besitzen.

Der Beweis, daß die Veränderungen auf Mutationen im Strukturgen des Proteins beruhen, konnte auf folgende Weisen erbracht werden:

1. durch den gelelektrophoretischen Nachweis beider Proteinformen nebeneinander;
2. durch die Bestimmung einer intermediären Resistenz in heterodiploiden Stämmen *in vivo*;
3. durch den Nachweis, daß sich Ribosomen aus solchen Stämmen im PolyU-abhängigen Proteinsynthesesystem gegenüber Cycloheximid wie eine Mischpopulation von Ribosomen des Wildtyps und der Mutante verhalten.

Der Befund, daß in zwei verschiedenen Mutantenformen des Proteins YL24 dieselbe Aminosäure, ja sogar dieselbe Base des dazugehörigen Codons gegen eine andere ausgetauscht worden ist, erinnert an die Veränderungen des Proteins S12 in Streptomycin-resistenten Stämmen von *E. coli*. Auch hier führen verschiedene Aminosäureaustausche in derselben Position des Proteins zu Resistenz (16). Ebenso wurden Mutationen der Proteine S4 und S5 von *E. coli* in scharf begrenzten Bereichen lokalisiert.

Das tryptische Peptid T24, in dem die Aminosäureaustausche lokalisiert wurden, weist eine ungewöhnliche Häufung von Histidin-Resten auf.

Histidin im aktiven Zentrum von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen spielt eine wichtige Rolle bei der Aminoacylierung der tRNS (111). Eine ähnliche Rolle dieser Aminosäure bei der Bindung der tRNS durch die 60S Untereinheit des Ribosoms ist denkbar.

Semidominanz der cyh-x32 Mutation

Die cyh-x32 Mutation kann aufgrund des Phänotyps heterodiploider Stämme mit dem Genotyp cyh-x32/cyh⁺ weder als dominant noch als rezessiv bezeichnet werden. Dieses Resistenzverhalten wurde bereits mehrfach bei der Untersuchung Cycloheximid-resistenter Mutanten beobachtet und mit dem Begriff Semidominanz belegt (69,73). Die MHK-Werte liegen jedoch nicht wie die in vivo Resistenzwerte genau zwischen denen der Wildtyp- und Mutantenstämme, sondern wesentlich niedriger. Diese Diskrepanz zwischen den in vivo und in vitro Daten läßt sich damit erklären, daß das PolyU-System ein reines Elongationssystem darstellt und deshalb der Einfluß des Antibiotikums auf die Initiation und Termination der Translation nicht zum Ausdruck kommt.

Resistenzursachen in anderen Cycloheximid-resistenten Mutanten

Es konnte gezeigt werden, daß die meisten der isolierten Cycloheximid-resistenten Mutanten mit cyh2-Stämmen eine Komplementationsgruppe bilden. Nur einige der niedrigresistenten Isolate tragen offensichtlich eine Mutation in einem anderen als dem cyh2-Gen. Für die Ausprägung des Resistenz-Phänotyps in diesen Stämmen gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten:

a) Veränderungen in anderen ribosomalen Proteinen können die Bindung bzw. den hemmenden Einfluß des ans Ribosom gebundenen Antibiotikums verringern.

Die Kreuzresistenz der Mutante cy32 gegen Antibiotika, die die Cycloheximid-Bindung nicht beeinflussen (siehe unten), zeigt, daß die Mutation des Proteins YL24 die Konformation des Ribosoms über die Cycloheximid-Bindungsstelle hinaus verändert. Umgekehrt können Veränderungen in anderen ribosomalen Proteinen Auswirkungen auf den Effekt von Cycloheximid haben. So konnte kürzlich Kreuzresistenz gegen Cycloheximid für eine Axenomycin-resistente Mutante von *S. cerevisiae* mit veränderter 60S-Untereinheit nachgewiesen werden (112).

Eine veränderte Sensitivität gegenüber Cycloheximid findet sich häufig in Suppressor-Mutanten (52; A.P. Surguchov, persönliche Mitteilung), die möglicherweise mutierte ribosomale Proteine besitzen (49,50). Die unterschiedliche in vitro Resistenz von Suppressor- und Antisuppressor-Stämmen weist darauf hin, daß in *S. cerevisiae* ähnlich wie in *E. coli* die "Fidelity" der Translation durch ribosomale Mutationen sowohl erniedrigt als auch erhöht werden kann und daß sich die Gegenwart von Cycloheximid in einer Herabsetzung der Fidelity auswirkt.

b) Die Aufnahmeexperimente haben gezeigt, daß die Zellwand der beiden untersuchten Stämme, nämlich des Wildtyps A364A und der Mutante cy32 offensichtlich frei permeabel für Cycloheximid ist. Ähnliche Ergebnisse wurden für andere Cycloheximid-resistente Mutanten beschrieben (73). Es ist demnach denkbar,

daß eine Reihe unspezifischer Mutationen der Zellwand einen Einfluß auf die Durchlässigkeit für das Antibiotikum haben.

Die Hochresistenz des Stamms 200-1, eines Derivats der Mutante SR17, wurde in einem zweiten Mutationsschritt erworben. Da sich aber beide Mutanten weder in der Bindungsaffinität ihrer Ribosomen für das Antibiotikum noch im zweidimensionalen Elektropherogramm ihrer ribosomalen Proteine unterscheiden, muß eine veränderte Aufnahme als Ursache für die erhöhte Resistenz in Betracht gezogen werden.

Bindung von Cycloheximid an Ribosomen

Mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse konnte gezeigt werden, daß Cycloheximid spezifisch und mit hoher Affinität an eine Stelle der ribosomalen 60S-Untereinheit bindet. Damit läßt sich auch die Resistenz der großen Untereinheit der Mutante cy32 im PolyU-abhängigen Proteinsynthesystem erklären, ebenso wie die Tatsache, daß fast ausschließlich Mutationen der großen Untereinheit ribosomale Cycloheximid-Resistenz verursachen.

Die Spezifität der Cycloheximid-Bindung geht daraus hervor, daß andere Proteinsynthese-Inhibitoren (Anisomycin, Emetin, Hygromycin B, Trichodermin und Verrucarín A), die gleiche oder ähnliche ribosomale Funktionen der Ribosomen hemmen, gebundenes Cycloheximid nicht verdrängen können.

Für die 40S-Untereinheit konnte zwar keine Bindung des Antibiotikums nachgewiesen werden, es stellte sich aber heraus, daß sie die Bindungsstelle auf der 60S-Untereinheit in Abwesenheit eines "Faktors" blockiert.

Die Zustände, in denen sich die Cycloheximid-Bindungsstelle von Ribosomen des Wildtyps und der Mutante cy32 unter verschiedenen Bedingungen befinden, sollen durch ein Modell veranschaulicht werden (Abb.19).

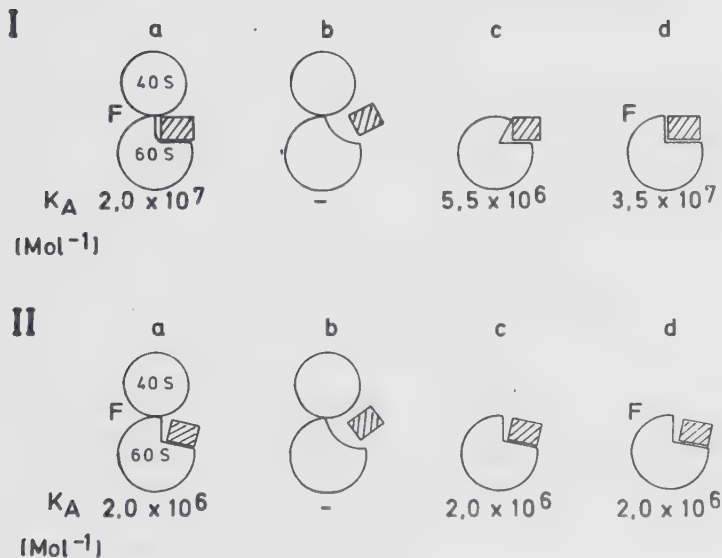


Abbildung 19: Modell für die Bindung von Cycloheximid (▨) an Ribosomen bzw. ribosomale Untereinheiten vom Wildtyp A364A (I) und von der Mutante cy32 (II) in Abhängigkeit von den Testbedingungen.
F: Faktor

Zustand Ia gilt für Niedrigsalzribosomen, die einen gebundenen Faktor enthalten, der durch Hochsalzbehandlung abgewaschen wird (Zustand Ib). Dieser Faktor öffnet die Bindungsstelle des Ribosoms für das Antibiotikum, möglicherweise durch kompetitive Verdrängung der kleinen Untereinheit. Die Abtrennung der 40S-Untereinheit durch Gradientenzentrifugation führt jedoch nur zu einer teilweisen Öffnung der Bindungsstelle (Zustand Ic). Die höchste Affinität wurde nach Zugabe von Faktor-enthaltenden Fraktionen zu 60S-Untereinheiten gemessen (Zustand Id). Es sind demnach zwei Effekte des Faktors auf die Cycloheximid-Bindung zu unterscheiden: die Aufhebung der Blockierung der Bindungsstelle durch die 40S-Untereinheit und die Affinitätssteigerung der 60S-Untereinheit.

Für Ribosomen und Untereinheiten der Mutante cy32 läßt sich dagegen nur der erste Effekt beobachten. So können zwei verschiedene Zustände der Bindungsstelle beschrieben werden, nämlich einer, der keine Bindung von Cycloheximid zuläßt (Zustand IIb) und einer, in dem das Antibiotikum mit einer Affinität von $2 \times 10^6 \text{ Mol}^{-1}$ gebunden wird (Zustand IIa, IIc und IId).

Eine Möglichkeit, die aus dem Modell hervorgehenden Unterschiede zwischen Wildtyp- und Mutantenribosomen zu erklären, ist die, daß der "Faktor" mit dem ribosomalen Protein YL24 identisch ist. Sie konnte jedoch aufgrund des beobachteten Effekts von Wildtyp-Faktor auf die Bindung von Cycloheximid durch Mutanten-Ribosomen bzw. von Mutanten-Faktor auf die Antibiotikumsbindung durch Wildtyp-Ribosomen ausgeschlossen werden. Zudem war gelelektrophoretisch kein YL24 Protein im S100 Extrakt des Wildtyps nachweisbar.

Folglich ist in der Mutante cy32 nicht der Faktor selbst, sondern der Einfluß des Faktors auf die Cycloheximid-Bindung durch die Mutation des Proteins YL24 verändert. Dieser Mutationseffekt trägt möglicherweise zur Resistenz bei.

Ein Faktor, der Cycloheximid-Sensitivität von Heferibosomen vermittelt, wurde bereits beschrieben (113). Die Bindungsdaten berechtigen zu der Annahme, daß die beiden "Faktoren" identisch sind. Ob es sich dabei um einen Initiations- oder Elongationsfaktor handelt, bleibt zu klären.

Die Untersuchung der Cycloheximid-Bindung durch Ribosomen der vier resistenten Mutanten mit verändertem Protein YL24 zeigte in allen Fällen einen Zusammenhang zwischen Resistenz und verringerter Bindungsaffinität. Diese Korrelation ist jedoch nicht quantitativ. So unterscheiden sich die MHK-Werte der Mutanten sp1 und SR17 um den Faktor 10, obwohl deren Ribosomen Cycloheximid mit nahezu gleicher Affinität binden. Eine zusätzliche Mutation im Stamm SR17, die z.B. eine verminderte Aufnahme des Antibiotikums zur Folge hat, kann ausgeschlossen werden, da er eine Einschnittmutante darstellt. Neben der Möglichkeit, daß sich die Bindung von Cycloheximid an die Ribosomen der beiden Stämme unterschiedlich auf die Funktionen der Organelle auswirkt, ist auch für eine der Mutanten ein Einfluß der Mutation des Proteins YL24 auf die Bindung bzw. Funktionen des Faktors vorstellbar.

Liegen die Gene für ribosomale Proteine von *S. cerevisiae*
in Transkriptionseinheiten?

YL24 ist das erste ribosomale Protein in *S. cerevisiae*,
dessen Strukturgen identifiziert werden konnte.

Inzwischen wurden zwei weitere Strukturgene für die ribo-
somalen Proteine L3 (45) und S11 (47) beschrieben.

Daneben kommen lts- (Kältesinsitivität), sup- (Suppressor)
und weitere cyh-Gene sowie das cry1-(Cryptopleurin-Resistenz)
und das AXE-Gen (Axenomycin-Resistenz) als mögliche Struktur-
gene ribosomaler Proteine in Frage. Alle diese Genorte liegen
verstreut auf 5 Chromosomen.

Bisher liegen also keine Hinweise auf eine Anordnung von
Strukturgenen ribosomaler Proteine in Transkriptionseinheiten
und eine sich daraus ergebende koordinierte Kontrolle der
Synthese dieser Proteine, wie sie für *E. coli* beschrieben
ist, vor.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Funktion und die Regulation der Komponenten der Proteinbiosynthese in Prokaryonten konnte mit Hilfe von Mutanten weitgehend geklärt werden. In den letzten Jahren wurde deshalb verstärkt die Translation in Eukaryonten Gegenstand der Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Isolierung und Charakterisierung von Proteinsynthesemutanten von *S. cerevisiae* ein Schritt in dieser Richtung unternommen.

Zur Untersuchung von Proteinsynthese-Defekten wurden Mutanten isoliert, die folgenden Klassen zugehören:

- Temperaturkonditionale (kälte- und temperatursensitive) Mutanten, die bei 15°C bzw. 36°C nicht zu wachsen vermögen
- Suppressormutanten, die durch Selektion von "Revertanten" temperatursensitiver Aminoacyl-tRNS-Synthetase-Mutanten auf Wachstum bei der für sie restriktiven Temperatur selektiert wurden
- Antibiotika-resistente Mutanten

Die biochemische und genetische Untersuchung dieser Mutanten führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Von 250 temperatur- und 150 kältesensitiven Mutanten konnten aufgrund der Ergebnisse von Markierungsexperimenten 9 als Proteinsynthesemutanten bestimmt werden.

Für zwei dieser Stämme (ts13 und ts181) wurde in vitro ein Defekt in einer Aminoacyl-tRNS-Synthetase (für Prolin und Valin) nachgewiesen.

2. Da der Defekt einer Aminoacyl-tRNS-Synthetase durch Mutationen ribosomaler Proteine kompensiert werden kann (105), wurden 300 Revertanten von temperatursensitiven Aminoacyl-tRNS-Synthetase-Mutanten isoliert. Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämme konnte der Nachweis eines veränderten ribosomalen Proteins jedoch nicht erbracht werden.

3. Ribosomale Mutationen konnten dagegen in Antibiotika-resistenten Stämmen nachgewiesen werden. Veränderte Formen des Proteins YL24 führen in den Mutanten cy32, sp1, SR17 und 200-1 zu Cycloheximid-Resistenz. Elektrophoretisch wurde eine mehr saure und eine mehr basische Form gefunden. Die proteinchemische und biochemische Analyse dieser Mutanten lieferte folgende Ergebnisse:

a) Die Auftrennung tryptischer Peptide des Proteins YL24 des Wildtyps, der mehr basischen Proteinform der Mutante cy32 und der mehr sauren Form der Mutante sp1 ergab, daß in beiden Mutantenproteinen dasselbe Peptid verändert ist. Durch Bestimmung der Aminosäuresequenz dieses Peptids (T24) und der in den Mutanten neu auftauchenden Peptide konnte jeweils ein Austausch derselben neutralen Aminosäure gegen eine basische bzw. saure Aminosäure nachgewiesen werden, nämlich Glutamin gegen Glutaminsäure (Mutante sp1) bzw. Glutamin gegen Lysin (Mutante cy32). Die Sequenz des Peptids T24 ist:

Gly-Met-Ala-Gly-Gly-Gln-His-His-His-Arg.

Der Austausch Glutamin gegen Glutaminsäure konnte ferner durch gelelektrophoretische Auftrennung von mit Staphylo-

coccen-Protease gespaltenen Peptiden des Wildtyps und der Mutante sp1 bestätigt werden.

b) Durch Gleichgewichtsdialyse wurde ermittelt, daß Wildtyp-ribosomen eine spezifische, hochaffine Bindungsstelle für Cycloheximid besitzen, für die Bindung des Antibiotikums jedoch einen zusätzlichen "Faktor" benötigen, der während der Präparation der Ribosomen teilweise von diesen abgewaschen wird. 60S-Untereinheiten dagegen binden Cycloheximid auch in Abwesenheit des Faktors, wenn auch mit geringerer Affinität. 60S-Untereinheiten der Mutante cy32 unterscheiden sich von denen des Wildtyps darin, daß ihre Affinität gegenüber Cycloheximid durch Zugabe des Faktors nicht erhöht werden kann. 40S-Untereinheiten zeigen keine Bindung. Die Bindungsaffinitäten der Ribosomen von allen vier untersuchten Cycloheximid-resistenten Mutanten sind gegenüber der für Wildtypribosomen gemessenen erniedrigt, jedoch nicht in strikter Korrelation zur in vivo Resistenz.

c) Aufnahmeexperimente an Zellen des Wildtyps und der Mutante cy32 deuten auf eine freie Permeabilität der Zellwand beider Stämme für Cycloheximid hin.

d) Das Strukturgen des Proteins YL24 wurde im Genort cyh2 auf dem Chromosom VII als erstes Gen eines ribosomalen Proteins von *S. cerevisiae* lokalisiert.

e) Komplementationsversuche ergaben, daß bis auf wenige niedrig-resistente alle Cycloheximid-resistenten Stämme im cyh2 Gen mutiert sind.

f) In heterodiploiden Stämmen (cyh/cyh^+) werden beide Proteinformen synthetisiert und in aktive Ribosomen eingebaut. Dies konnte durch in vivo und in vitro Experimente sowie gelelektrophoretische Untersuchungen nachgewiesen werden.

g) Die Mutante cy32 erwies sich als kreuzresistent gegenüber anderen Inhibitoren der Proteinbiosynthese. Diese hatten jedoch keinen Einfluß auf die Cycloheximid-Bindung an Ribosomen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lengyel, P. (1974) in Ribosomes (Hrsg. Nomura, M., Tissieres, A., Lengyel, P.) 13 Cold Spring Harbor Laboratory
2. Wool, I.G. (1980) in Ribosomes (Hrsg. Chambliss, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M.) 797 University Park Press, Baltimore
3. Vazquez, D. (1979) in Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics (Hrsg. Kleinzeller, A., Springer, G.F., Wittmann, H.G.) Vol. 30 Springer-Verlag, Berlin
4. Kruiswijk, T., Planta, R.J., Krop (1978) Biochim. Biophys. Acta 517, 378
5. Monk, R.J., Meyuhas, O., Ferry, R.P. (1981) Cell 24, 301
6. Woolford, J.L., Hereford, L.L., Rosbash, M. (1979) Cell 18, 1247
7. Nomura, M., Post, L.E. (1980) in Ribosomes (Hrsg. Chambliss, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M.) 671 University Park Press, Baltimore
8. Wirth, R., Böck, A. (1980) Molec. gen. Genet. 178, 479
9. Gorenstein, C., Warner, J.R. (1977) Molec. gen. Genet. 157, 327
10. Stoyanova, B.B., Dabeva, P.D. (1980) Biochim. Biophys. Acta 608, 358
11. Piepersberg, W., Geyl, D., Hummel, H., Böck, A. (1980) in Genetics and Evolution of RNA Polymerase, tRNA and Ribosomes (Hrsg. Osawa, S., Ozeki, H., Uchida, H., Yura, T.) 359 University of Tokyo Press
12. Isono, K. (1980) in Ribosomes (Hrsg. Chambliss, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M.) 641 University Park Press, Baltimore

13. Guthrie, C., Nashimoto, H., Nomura, M. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. 63, 384
14. Gausling, K. (1980) in Ribosomes (Hrsg. Chambliss, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M.) 693 University Park Press, Baltimore
15. Brimacombe, R., Stöffler, G., Wittmann, H.G. (1978) Annu. Rev. Biochem. 47, 217
16. Wittmann, H.G., Wittmann-Liebold, B. (1974) in Ribosomes (Hrsg. Nomura, M., Tissieres, A., Lengyel, P.) 115 Cold Spring Harbor Laboratory
17. Pestka, S. (1977) in Molecular Mechanisms of Protein Synthesis (Hrsg. Weissbach, H., Pestka, S.) 468 Academic Press, New York
18. Dabbs, E.R., Wittmann, H.G. (1976) Molec. gen. Genet. 149, 303
19. Gorini, L. (1974) in Ribosomes (Hrsg. Nomura, M., Tissieres, A., Lengyel, P.) 791 Cold Spring Harbor Laboratory
20. Lomose, H., Gorini, L. (1971) Genetics 67, 19
21. Bollen, A., Cabezón, P., De Wilde, M., Villarroel, R., Herzog, A. (1974) J. Mol. Biol. 99, 795
22. Kühberger, R., Piepersberg, W., Fetzet, A., Buckel, F., Böck, A. (1979) Biochemistry 18, 187
23. Piepersberg, W., Böck, A., Wittmann, H.G. (1975) Molec. gen. Genet. 140, 91
24. Hasenbank, R., Guthrie, C., Stöffler, G., Wittmann, H.G., Rosen, L., Apirion, D. (1973) Molec. gen. Genet. 127, 1
25. Gorini, L. (1970) Ann. Rev. Genetics 4, 107
26. Ozeki, H., Inokuchi, H., Yamao, A., Kodaira, I., Sakano, H., Ikenura, T., Shimura, Y. (1980) in Transfer RNA: Biological Aspects (Hrsg. Söll, D., Abelson, J.N., Schimmel, P.R.) 341 Cold Spring Harbor Laboratory

27. Buckingham, R.H., Kurland, C.C. (1980) in Transfer RNA: Biological Aspects (Hrsg. Söll, D., Abelson, J.N., Schimmel, P.R.) 421 Cold Spring Harbor Laboratory
28. Wittmann, H.G., Stöffler, G., Piepersberg, W., Buckel, P., Böck, A. (1974) Molec. gen. Genet. 134, 225
29. Wittmann, H.G., Stöffler, G., Geyl, D., Böck, A. (1975) Molec. gen. Genet. 141, 317
30. Böck, A., Ruffler, D., Piepersberg, W., Wittmann, H.G. (1974) Molec. gen. Genet. 134, 325
31. Nashimoto, H., Uchida, H. (1975) J. Mol. Biol. 96, 443
32. Geyl, D., Böck, A., Wittmann, H.G. (1977) Molec. gen. Genet. 152, 331
33. Bachman, B.J., Low, K.B. (1980) Microb. Rev. 6, 56
34. Stöffler, G., Bald, R., Kastner, B., Lührmann, R., Stöffler-Meilicke, M., Tischendorf, G., Tesche, B. (1980) in Ribosomes (Hrsg. Chambliss, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M.) 171 University Park Press, Baltimore
35. Lake, J.A. (1980) in Ribosomes (Hrsg. Chambliss, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M.) 207 University Park Press, Baltimore
36. Andrew, C., Hopper, A.K., Hall, B.D. (1976) Molec. gen. Genet. 144, 29
37. Ursic, D., Davies, J. (1979) Molec. gen. Genet. 175, 313
38. Bayliss, F.T., Ingraham, J.L. (1974) J. Bact. 118, 319
39. Zinker, S., Warner, J.R. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1799
40. Coddington, A., Fluri, R. (1977) Molec. gen. Genet. 158, 93
41. Begueret, J., Perrot, M., Crouzet, M. (1977) Molec. gen. Genet. 156, 141

42. Crouzet, M., Begueret, J. (1980) *Molec. gen. Genet.* 180, 177
43. Boersma, D., McGill, S., Mollenkamp, J., Roufa, D.J.
(1979) *J. Biol. Chem.* 254, 559
44. Reichenbecher Jr., V.E., Caskey, C.T. (1979) *J. Biol. Chem.*
254, 6207
45. Fried, H.M., Warner, J.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 78, 238
46. Jimenez, A., Vazquez, D. (1975) *Eur. J. Biochem.* 54, 483
47. Ishiguro, J., Ono, B., Masurekar, M., McLaughlin, C.,
Sherman, F. (1981) *J. Mol. Biol.* 147, 391
48. Masurekar, M., Palmer, E., Ono, B.J., Wilhelm, J.M.,
Sherman, F. (1981) *J. Mol. Biol.* 147, 381
49. Surguchov, A.P., Berestetskaya, Y.V., Fominykh, E.S.,
Pospelova, E.M., Smirnov, V.N., Ter-Avanesyan, M.D.,
Inge-Vechtomov, S.G. (1980) *FEBS Letters* 111, 175
50. Surguchov, A.P., Fominykh, E.S., Berestetskaya, Y.V.,
Smirnov, V.N. (1980) *Molec. gen. Genet.* 177, 675
51. Hawthorne, D.C., Leupold, U. (1974) in *Current Topics in*
Microbiology and Immunology Vol. 64,1 Springer-Verlag, Berlin
52. Coppin-Raynal, E. (1977) *J. Bact.* 131, 876
53. Sealy-Lewis, H.M., Casselton, L.A. (1978) *Molec. gen.*
Genet. 164, 211
54. Bayliss, F.T., Vinopal, R.T. (1971) *Science* 174, 1339
55. Schlanger, G., Friedman, S.M. (1973) *J. Bact.* 115, 129
56. Picard-Bennoun, M., Coppin-Raynal, E. (1977) *Physiol.*
Veg. 15, 481

57. Palmer, E., Wilhelm, J.M. (1978) Cell 13, 329
58. Singh, A., Ursic, D., Davies, J. (1979) Nature 277, 146
59. Dequard, M., Couderc, J.L., Legrain, P., Belcour, L.,
Picard-Bennoun, M. (1980) Biochem. Genet. 18, 263
60. Picard-Bennoun, M. (1981) Molec. gen. Genet. 183, 175
61. Mortimer, R.K., Schild, D. (1980) Microbiol. Rev. 44, 519
62. Carter, B.L.A. (1975) Cell 6, 259
63. Hartwell, L.H. (1967) J. Bact. 93, 1662
64. Hartwell, L.H., McLaughlin, C. (1968) J. Bact. 96, 1664
65. McLaughlin, C., Hartwell, L.H. (1969) Genetics 61, 557
66. Warner, J.R., Udem, S.A. (1972) J. Mol. Biol. 65, 243
67. Surguchov, A.P., Fominykh, E.S., Smirnov, V.N., Ter-
Avanesyan, M.D., Mironova, L.N., Inge-Vechtomov, S.G.
(1981) Biochim. Biophys. Acta 654, 149
68. Stöcklein, W., Piepersberg, W. (1980), Current Genet. 1, 177
69. Sutton, C.A., Ares, J.M., Hallberg, R.L. (1978) Proc. Natl.
Acad. Sci. 75, 3158
70. Singh, A., Manney, T.R. (1974) Genetics 77, 651
71. Vomvoyanni, V.E., Argyrakakis, M.P. (1979) J. Bact. 139, 620
72. Cooper, T.G., Bossinger, J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7278
73. Cooper, T.G., Banthorpe, D., Wilkie, D. (1967) J. Mol. Biol.
26, 347
74. Jimenez, A., Littlewood, B., Davies, J. (1972) in Molecular
Mechanisms of Antibiotic Action on Protein Synthesis and
Membranes (Hrsg. Munoz, E., Garaia-Ferrandiz, F., Vazquez, D.)
292 New York, Elsevier

75. Zeijst, B.A. van der, Kool, A.J., Bloemers, H.P.J. (1972) Eur. J. Biochem. 30, 15
76. Fink, G.R. (1970) in Methods in Enzymology Band XII A (Hrsg. Tabor, H., Tabor, C.W.) Academic Press New York
77. Siddiqi, B.A. (1971), Hereditas 69, 67
78. Mortimer, R.K., Hawthorne, D.C. (1975) in Methods in Cell Biology, Vol. XI (Hrsg. D.M. Prescott) 221 Academic Press, New York
79. Sherman, F. (1975) in Methods in Cell Biology, Vol. XI (Hrsg. D.M. Prescott) 189 Academic Press New York
80. Carter, C.J., Cannon, M., Jimenez, A. (1980) Eur. J. Biochem. 107, 173
81. Kosakowski, H.M., Böck, A. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 67
82. Laemmli, U.K., Favre, M. (1973) J. Mol. Biol. 80, 575
83. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680
84. Hardy, S.J.S., Kurland, C.G., Voynow, P., Mora, G. (1969) Biochemistry 8, 2897
85. Mets, L.J., Bogorad, L. (1974) Analyt. Biochem. 57, 200
86. Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G. (1970) Analyt. Biochem. 36, 401
87. Geyl, D., Böck, A., Isono, K. (1981) Molec. gen. Genet. 181, 309
88. Böck, A., Petzet, A., Piepersberg, W. (1979) FEBS Letters 104, 317
89. Barbacid, M., Vazquez, D. (1974) Eur. J. Biochem. 44, 437

90. Mazelis, A.G., Petermann, M.L. (1973) Biochim. Biophys. Acta 312, 111
91. Hennecke, H., Böck, A., Thomale, J., Nass, G. (1977) J. Bacteriol. 131, 943
92. Stöffler, G., Wittmann, H.G. (1971) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 68, 2283
93. Ouchterlony, O. (1949) Acta Pathol.Microbiol.Scand.26, 507
94. Itoh. T., Higo, K., Otaka, E. (1979) Biochemistry 18, 5787
95. Itoh, T., Wittmann, H.G. (1973) Molec.gen.Genet. 127, 19
96. Wittmann-Liebold, B., Wittmann, H.G. (1971) Biochim. Biophys.Acta 251, 44
97. Fishbein, J.C., Place, A.R., Ropson, I.J., Powers, D.A., Sofer, W. (1980) Analyt.Biochem. 108, 193
98. Yamada, S., Itano, H.A. (1966) Biochim.Biophys.Acta 130, 538
99. Houmard, J., Drapeau, G.R. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci.69, 12
100. Chang, J.Y., Brauer, D., Wittmann-Liebold, B. (1978) FEBS Letters 93, 205
101. Ehresman, B., Imbault, P., Weil, J.H. (1973) Analyt. Biochem. 54, 454
102. Hawthorne, D.C., Frijs, J. (1973) Genetics 50, 829
103. Steinberg, W. (1974) J. Bacteriol. 120, 767
104. Straus, D.C., Ames, B.N. (1973) J. Bacteriol. 115, 118
105. Buckel, P., Piepersberg, A., Böck, A. (1976) Molec. gen.Genet. 149, 51
106. Otaka, E., Osawa, S. (1981) Molec.gen.Genet. 181, 176
107. Wilkie, D., Lee, B.K. (1965) Genet.Res.Camb. 6, 130

108. Otaka, E., Kobata, K. (1978) *Molec.gen.Genet.* 162, 259
109. Itoh, T., Higo, K., Otaka, E., Osawa, S. (1980) in *RNA Polymerase, tRNA and Ribosomes* (Hrsg. Osawa, S., Ozeki, H., Uchida, H., Yura, T.) 609 University of Tokyo Press, Elsevier
110. Ofengand, J. (1977) in *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis* (Hrsg. Weissbach, H., Pestka, S.) 8 Academic Press New York
111. Weber, A. L., Lacey, J. C. (1975) *J. Mol. Evol.* 6, 309
112. Sora, S., Ciferri, O., Di Pasquale, G., Magni, G.E. (1980) *Curr. Genet.* 2, 61
113. Somasundaran, U., Skogerson, L. (1976) *Biochemistry* 15, 4760

Herrn Professor Dr. A. Böck möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit, seine hilfreichen Ratschläge und Diskussionsbeiträge sowie für die wissenschaftliche Förderung, die er mir zuteil werden ließ, herzlich danken.

Für seine Diskussionsbeiträge und wertvollen Hinweise danke ich Herrn Dr. W. Piepersberg.

Meiner Mutter möchte ich für die Drucklegung dieser Arbeit Dank sagen.

Lebenslauf

- Geboren am 7.12.1951 in München
- Eltern: Karl Stöcklein, Textilkaufmann
Eleonora Stöcklein, geb. Eickemeyer, kaufm. Angestellte
- 1958 bis 1962 Besuch der Volksschule am Gotzinger Platz
in München
- 1962 bis 1971 Besuch des Klenze-Gymnasiums in München, dort
- 1971 Abitur
- 1970 bis 1980 Dienst im Katastrophenschutz beim ASB (Arbeiter-
Samariter-Bund) München, später BRK Regensburg
- WS 1971 Immatrikulation an der LMU München, Fakultät für Biologie,
mit Studiums-Ziel Diplom
- SS 1973 dort Vordiplom
- SS 1974 Wechsel an die Universität Regensburg, dort
- Okt. 1977 Abschluß des Studiums mit Diplom
Diplomarbeit durchgeführt am Lehrstuhl für Mikrobiologie
unter Anleitung von Prof. Dr. A. Böck
- Nov. 1977 Beginn der Promotion bei Prof. Dr. A. Böck
- Okt. 1977 mit Prof. Böck Umzug an das Institut für Genetik und
Mikrobiologie der Fakultät für Biologie der LMU München

.....

